

**Humane rekombinante Antikörper  
gegen CEA und NKG2D  
in mono- und bispezifischen Formaten**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
**D i s s e r t a t i o n**

von Susanne Meyer  
aus Schönebeck/Elbe

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Professor Dr. Matthias Peipp
eingereicht am:	06.09.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	21.01.2020

Druckjahr 2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1 Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie.....	5
3.1.1 Therapiestrategien und Antikörperformate .....	7
3.1.2 "Next Generation"-Antikörper in der Krebstherapie.....	14
3.1.3 Bispezifische Antikörper .....	17
3.2 Das Tumor-assoziierte Antigen CEA .....	24
3.2.1 Die CEACAM-Familie.....	24
3.2.2 Expressionsmuster und physiologische Funktion .....	26
3.2.3 Expression und Funktion im malignen Gewebe.....	27
3.2.4 Bedeutung als Tumormarker .....	28
3.3 NK-Zellen und der aktivierende Rezeptor NKG2D .....	30
3.3.1 NK-Zellen .....	30
3.3.2 Der NKG2D-Rezeptor .....	32
3.3.3 Die NKG2D-Liganden .....	34
3.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	36
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
4.1 Material.....	37
4.1.1 Geräte und Zubehör .....	37
4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	38
4.1.3 Chemikalien.....	39
4.1.4 Lösungen und Puffer .....	39
4.1.5 Medien und Supplemente .....	43
4.1.6 Bakterienstämme, Bakteriophagen und eukaryotische Zelllinien .....	45

4.1.7 Plasmide .....	45
4.1.8 Oligonukleotide.....	46
4.1.9 Enzyme.....	47
4.1.10 Antikörper.....	47
4.1.11 Kit-Systeme .....	48
4.1.12 Software und Datenbanken.....	48
4.1.13 Sonstiges .....	49
4.2 Molekularbiologische Methoden .....	50
4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	50
4.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR .....	50
4.2.3 Agarosegelelektrophorese .....	52
4.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten .....	52
4.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	52
4.2.6 Enzymatische Restriktion von DNA.....	52
4.2.7 Dephosphorylierung von DNA .....	53
4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten .....	53
4.2.9 Sequenzierung .....	54
4.3 Mikrobiologische Methoden .....	54
4.3.1 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	54
4.3.2 Anlage von Glycerinstocks .....	55
4.3.3 Selektion von Antikörpern mittels Phagen-Display und <i>Panning</i> .....	55
4.3.4 Infektion von <i>E. coli</i> und Produktion von Antikörperphagen.....	56
4.3.5 Titerbestimmung von M13K07-Phagen.....	57
4.3.6 Produktion von scFv-Antikörperfragmenten .....	57
4.4 Proteinbiochemische Methoden .....	58
4.4.1 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie .....	58
4.4.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	60
4.4.3 ELISA ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ).....	60
4.4.4 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	62
4.4.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen .....	63
4.4.6 Western Blot .....	63
4.4.7 Immunfärbung.....	64

4.5 Biophysikalische Methoden .....	64
4.5.1 Größenausschlusschromatografie (SEC) .....	64
4.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR) .....	65
4.6 Zellbiologische Methoden .....	66
4.6.1 Kultivierung von humanen Zelllinien.....	66
4.6.2 Bestimmung der Zelldichte und der Zellvitalität (Trypanblau-Ausschluss) ..	66
4.6.3 Lagerung von Zelllinien .....	67
4.6.4 Transiente Transfektion von HEK293-6E-Zellen .....	67
4.6.5 Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie .....	68
4.6.6 Isolation von peripheren Blutlymphozyten .....	69
4.6.7 Calcein-AM-Zytotoxizitätsassay .....	70
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
5.1 ScFv-Antikörper für die Generierung unterschiedlicher mono- und bispezifischer Formate .....	73
5.2 Klonierung und Charakterisierung CEA-spezifischer scFv-Fc-Antikörper .....	74
5.2.1 Antigenspezifität auf HEK293-6E Zellen .....	76
5.2.2 CEA-Spezifität der Antikörper auf Tumorzelllinien .....	78
5.2.3 Affinitätsbestimmung der CEA-spezifischen Antikörper im scFv-Fc- und IgG-Format .....	81
5.2.4 Analyse des Aggregationsverhaltens der Antikörper .....	84
5.2.5 Bestimmung der Antikörperbindungsbereiche im Antigen CEA.....	85
5.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung CEA- spezifischer Antikörper.....	88
5.3 Charakterisierung NKG2D-spezifischer Antikörper im scFv-Fc-Format.....	89
5.3.1 Spezifische Antigenbindung auf HEK293-6E-Zellen .....	90
5.3.2 Analyse der Antigenspezifität auf der Zelllinie NK-92.....	91
5.3.3 Affinitätsbestimmung von SyD99-B5 und SyD99-B8.....	93
5.3.4 Aggregationsverhalten NKG2D-spezifischer Antikörper im scFv-Fc- Format.....	95
5.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung NKG2D- spezifischer Antikörper.....	96
5.4 Bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format .....	97

5.4.1	Konstruktion bispezifischer Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format.....	97
5.4.2	Charakterisierung von Fc-scFv-Antikörpern .....	99
5.4.3	SEC mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format.....	101
5.5	Mono- und bispezifische Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil.....	104
5.5.1	Klonierung monospezifischer Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil.....	104
5.5.2	Klonierung bispezifischer Antikörper im IgG-scFv-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil .....	106
5.5.3	Charakterisierung von Antikörpern im scFv-Fc-, IgG- und IgG-scFv-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil .....	107
5.6	Funktionelle Analyse von Antikörpern in verschiedenen Formaten .....	112
5.6.1	Zytotoxizitätstest (ADCC) der mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukte.....	112
5.6.2	Einfluss von Fc-Teil und NKG2D-spezifischem Antikörper auf die Zelllyse.....	114
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
6.1	Generierung und Charakterisierung von CEA-spezifischen monoklonalen Antikörpern im scFv-Fc-Format.....	117
6.2	Generierung und Charakterisierung von NKG2D -spezifischen monoklonalen Antikörpern im scFv-Fc-Format.....	124
6.3	Konstruktion und Charakterisierung bispezifische Anti-körper im scFv-Fc-scFv-Format.....	127
6.4	Mono- und bispezifische Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil .....	129
6.5	Fazit.....	133
6.6	Ausblick .....	135
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>171</b>
8.1	scFv-Fc-Produktionskontrolle mittels Western Blot mit Immunfärbung und <i>Human Capture</i> ELISA.....	171
8.2	SPR-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2.....	172
8.3	SEC-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2.....	173
8.4	Western Blot und Immunfärbung mit NKG2D-spezifischen Antikörpern.....	174

8.5 Western Blot mit Immunfärbung mit NK-92-Zellen.....	175
8.6 SEC-Messungen von SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc .....	175
8.7 SEC-Messungen von scFv-Fc- und Fc-scFv-Antikörpern .....	176
8.8 SEC-Messungen mit scFv-Fc-scFv-Antikörpern .....	177
8.9 SEC von Antikörpern im scFv-Fc-, IgG- und IgG-scFv-Format mit ADCC- optimiertem Fc-Teil .....	178
8.10 Zytotoxizitätstest zur funktionellen Analyse von Antikörpern.....	179
8.11 Produktion von Antikörpern im IgG- und IgG-scFv-Format .....	180
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>181</b>





# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Verringerung der Immunogenität von Antikörpern durch Chimerisierung und Humanisierung .....	7
Abbildung 3.2 Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G Antikörpers (IgG).....	8
Abbildung 3.3 Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) .....	12
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Strategien zur Generierung bispezifischer Antikörper .....	19
Abbildung 3.5 Die CEACAM-Familie.....	25
Abbildung 3.6 Der NKG2D-Rezeptor und seine Liganden .....	33
Abbildung 5.1 Klonierungskassetten der Vektoren pHAL14 und pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP.....	75
Abbildung 5.2 Titrations-ELISA mit CEA-spezifischen scFv-Fc-Antikörpern.....	75
Abbildung 5.3 Analyse der scFv-Fc-Antikörper SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc mittels Durchflusszytometrie auf HEK293-6E-Zellen .....	76
Abbildung 5.4 Western Blot mit Immunfärbung zur Überprüfung der Antigenspezifität und Art des gebundenen Epitops .....	77
Abbildung 5.5 Antigenbindung auf verschiedenen Tumorzelllinien .....	79
Abbildung 5.6 CEA-Nachweis auf verschiedenen Tumorzelllysaten .....	80
Abbildung 5.7 Klonierungskassetten der Vektoren pCSEH1c, pCSL3l und pCSL3k.....	82
Abbildung 5.8 SPR-Messung zur Affinitätsbestimmung von SUW59-A8-Fc und SUW59-A8-IgG .....	83
Abbildung 5.9 SEC zur Untersuchung der Aggregationsverhaltens von SUW59-A8 und SUW119-H2 .....	85
Abbildung 5.10 Schematische Darstellung der CEA-Konstrukte zur Bestimmung der Antikörperbindungsbereiche .....	86
Abbildung 5.11 Bestimmung der Antikörperbindungsbereiche im Antigen CEA.....	87
Abbildung 5.12 Titrations-ELISA mit auf NKG2D selektierten scFv-Fc-Antikörpern.....	89
Abbildung 5.13 Durchflusszytometrische Analyse auf HEK293-6E-Zellen .....	91
Abbildung 5.14 Durchflusszytometrie von anti NKG2D scFv-Fc Antikörpern auf NK-92-Zellen .....	92
Abbildung 5.15 Affinitätsbestimmung von SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc .....	94

Abbildung 5.16 SEC-Analyse der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc .....	95
Abbildung 5.17 Klonierungsstrategie zur Generierung bispezifischer Antikörper im scFv- Fc-scFv-Format .....	98
Abbildung 5.18 SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung zur Kontrolle der Produktion und Reinigung von Fc-scFv-Antikörpern.....	99
Abbildung 5.19 Durchflusszytometrische Analyse von scFv-Fc- und Fc-scFv- Antikörpern auf NK-92-Zellen.....	100
Abbildung 5.20 SEC zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens von Fc-scFv- Antikörpern.....	101
Abbildung 5.21 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung der Produktion und Reinigung von scFv-Fc-scFv-Antikörpern.....	102
Abbildung 5.22 SEC mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format .....	103
Abbildung 5.23 Klonierungskassetten der Vektoren pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP, pCSEH3c, pCSL3l und pCSL3k .....	105
Abbildung 5.24 Klonierungsstrategie zur Generierung bispezifischer Antikörper im IgG*- scFv-Format.....	106
Abbildung 5.25 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung von Produktion und Reinigung von scFv-Fc*-, IgG*- und IgG*-scFv-Antikörpern.....	107
Abbildung 5.26 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Antikörperformate auf LS-174T-Zellen .....	109
Abbildung 5.27 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Antikörperformate auf NK92-Zellen.....	110
Abbildung 5.28 SEC von SUW119-H2 in verschiedenen Antikörperformaten mit ADCC- optimiertem Fc-Teil (*) .....	111
Abbildung 5.29 ADCC-Assay mit mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukten .....	113
Abbildung 5.30 Zusammenfassung der Ergebnisse des ADCC-Assays mit mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukten.....	113
Abbildung 5.31 Titration von Antikörpern im ADCC-Assay.....	114
Abbildung 5.32 Einfluss von Fc-Teil und NKG2D-spezifischem Antikörper auf die Zelllyse im ADCC-Assay .....	115
Abbildung 6.1 Unterschiedliche Aggregationsneigung der generierten Antikörperformate..	133

---

Abbildung 8.1 Überprüfung der sekretorischen scFv-Fc-Produktion in HEK293-6E	
Zellen mittels Western Blot mit Immunfärbung .....	171
Abbildung 8.2 Ermittlung der linearen Regression des Standards im <i>Human Capture</i>	
ELISA .....	171
Abbildung 8.3 SPR-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2 .....	172
Abbildung 8.4 SEC-Analysen von SUW59-A8 und SUW119-H2 .....	173
Abbildung 8.5 Western Blot mit Immunfärbung mit NKG2D-spezifischen Antikörpern	
im scFv-Fc-Format.....	174
Abbildung 8.6 Western Blot und Immunfärbung mit NK-92-Zellen und NKG2D-	
spezifischen Antikörpern .....	175
Abbildung 8.7 SEC-Analysen der NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 und	
SyD99-B8 im scFv-Fc-Format .....	175
Abbildung 8.8 SEC-Analysen der NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 und	
SyD99-B8 im scFv-Fc-und Fc-scFv-Format .....	176
Abbildung 8.9 SEC-Messungen mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format .	177
Abbildung 8.10 SEC-Messungen von Antikörpern mit ADCC-optimiertem Fc-Teil (*).....	178
Abbildung 8.11 ADCC-Assay zum funktionellen Screening von Antikörpern .....	179
Abbildung 8.12 Titration von Antikörpern im ADCC-Assay .....	179
Abbildung 8.13 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung von Produktion und	
Reinigung von IgG- und IgG-scFv-Antikörpern .....	180



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Von der FDA für die Behandlung von Krebs zugelassene Antikörper (Stand Februar 2019).....	8
Tabelle 4.1 Verwendete Geräte und Zubehör.....	37
Tabelle 4.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	38
Tabelle 4.3 Verwendete Lösungen und Puffer .....	39
Tabelle 4.4 Verwendete Medien und Supplemente für die prokaryotische Kultivierung .....	43
Tabelle 4.5 Verwendete Medien und Lösungen für die eukaryotische Kultivierung.....	44
Tabelle 4.6 Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen.....	45
Tabelle 4.7 Verwendete eukaryotische Zelllinien .....	45
Tabelle 4.8 Verwendete Plasmide .....	45
Tabelle 4.9 Verwendete Oligonukleotide .....	46
Tabelle 4.10 Verwendete Enzyme .....	47
Tabelle 4.11 Verwendete Antikörper .....	47
Tabelle 4.12 Verwendete Kit-Systeme .....	48
Tabelle 4.13 Verwendete Software und Datenbanken .....	48
Tabelle 4.14 Zusätzliche Materialien .....	49
Tabelle 4.15 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen.....	50
Tabelle 4.16 Temperaturprofil einer PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen .....	51
Tabelle 4.17 Zusammensetzung einer Kolonie-PCR .....	51
Tabelle 4.18 Temperaturprofil einer Kolonie-PCR.....	51
Tabelle 4.19 Zusammensetzung eines Ansatzes für die enzymatische Restriktion .....	53
Tabelle 4.20 Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.....	54
Tabelle 4.21 Zusammensetzung von Trenn-und Sammelgelen für die SDS-PAGE.....	63
Tabelle 5.1 Mittels Phagendisplay selektierte scFv-Antikörper und zugehörige Keimbahnlinien .....	74
Tabelle 5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Affinitätsmessungen mittels SPR .....	84

Tabelle 5.3 Übersicht über die Ergebnisse der Charakterisierung CEA-spezifischer Antikörper .....	88
Tabelle 5.4 Ergebnisse der Affinitätsbestimmung der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc .....	94
Tabelle 5.5 Übersicht über die Ergebnisse der Charakterisierung NKG2D-spezifischer Antikörper .....	96

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in °Celsius
$\alpha$	Anti
A	Ampere
ADC	<i>Antibody drug conjugate</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADCP	<i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
ADEPT	<i>Antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Amoniumpersulfat
AT-Linker	Alanin-Threonin-Linker
AU	<i>Absorption units</i>
$A_{xyz\text{ nm}}$	Absorption bei deiner Wellenlänge von xyz nm
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCR4	<i>C-C chemokine receptor type 4</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CEA	Karzinoembryonales Antigen ( <i>Carcinoembryonic antigen</i> )
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
cfu	<i>Colony forming units</i>
CH	Konstante Domäne der schweren Kette
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIP	<i>Calf intestine phosphatase</i>
CL	Konstante Domäne der leichten Kette

CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAP10	<i>DNAX-activating-protein 10</i>
DART	<i>Dual-affinity re-targeting</i>
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNL	<i>Dock-and-Lock</i>
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DR5	<i>Death receptor 5</i>
DVD-Ig	<i>Dual-Variable-Domain-Immunglobuline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMPD	Extrazelluläre Membran-proximale Domäne
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment cristallisable/constant</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
Fv	<i>Fragment variable</i>
GITR	<i>Glucocorticoid induced TNF receptor family related gene</i>
GPI-Anker	Glykosylphosphatidyl-Anker
GS-Linker	Glycin-Serin-Linker
h	Stunde
HAL	<i>Human antibody library</i>
HAMA	<i>Human anti-mouse antibody</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	<i>Horse serum</i>



Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
$k_a$	Assoziationskonstante
kB	Kilobasen
$k_d$	Dissoziationskonstante
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
<i>KLRK1</i>	<i>Killer cell lectin-like receptor K1</i>
l	Liter
LRS	Leukozytenreduktionssystem
M	Molar
mA	Milli-Ampere
MAC	Membranangriffskomplex ( <i>Membrane attack complex</i> )
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MICA/B	<i>Major histocompatibility complex class I chain-related protein A/B</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMAE	Monomethyl auristatin E
mPa	Millipascal
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ m	Mikrometer
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NKG2D	<i>Natural killer group 2 member 2</i>
nm	Nanometer
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>Non small cell lung cancer</i> )
OD	Optische Dichte

Opa	<i>Opacity protein</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PD-1 Rezeptor	<i>Programmed death receptor-1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pM	Pikomolar
PSG	<i>Pregnancy-specific glycoprotein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RU	<i>Response units</i>
SALCL	Systemisches anaplastisch-großzelliges Lymphom
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEC	Größenausschlusschromatografie ( <i>Size exclusion chromatography</i> )
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SLAMF7	<i>Signaling lymphocytic activation molecule family member 7</i>
SMIP	<i>Small modular immunopharmaceutical</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz ( <i>Surface plasmon resonance</i> )
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math> receptor 1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
U	<i>Units</i>
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i>
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor-A</i>
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
w/v	<i>Weight per volume</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung



# 1 Zusammenfassung

Die Verwendung monoklonaler Antikörper stellt eine wichtige und erfolgreiche Option für die Diagnostik und Behandlung von Krebserkrankungen dar. Die Entwicklung neuer gentechnologischer Verfahren erlaubte Anfang der 1990er Jahre die Generierung genetisch vollständig humaner Antikörper. Neue *Screening*- und *Engineering*-Technologien ermöglichten darüber hinaus die Schaffung einer neuen Antikörpergeneration in einer Vielfalt an Formaten mit verbesserten Eigenschaften bei gleichzeitig reduzierter Immunogenität. Einen vielversprechenden Ansatz bilden die Generierung und der Einsatz bispezifischer Antikörper, welche zwei verschiedene Tumor-assoziierte Antigene binden können oder Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen und Effektorzellen erkennen.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von humanen monoklonalen Antikörpern gegen das Tumor-assoziierte Antigen CEA und das Effektorzellantigen NKG2D in verschiedenen mono- und bispezifischen Formaten hinsichtlich der Antigenbindung, des Aggregationsverhaltens und ihrer Funktionalität.

Ausgehend von scFv-Fragmenten, die mittels Phagendisplay und *Panning* aus einer Antikörpergenbibliothek selektiert wurden, konnten auf Grundlage eines Kassetten-basierten Vektorsystems erfolgreich Antikörper in den Formaten scFv-Fc, IgG, scFv-Fc-scFv und IgG-scFv z.T. mit ADCC-optimiertem Fc-Teil generiert und produziert werden. Die Antikörper wiesen in den verschiedenen Formaten eine spezifische Antigenbindung auf. Darüber hinaus konnte bei einem der CEA-spezifischen Antikörper der Einfluss von Aviditätseffekten auf die Antigenbindung nachgewiesen werden. Die Aggregationsneigung variierte in Abhängigkeit vom Format stark. Die geringste Aggregationsneigung wiesen Antikörper im IgG-Format auf, wohingegen die Tendenz zur Bildung von Dimeren am stärksten im scFv-Fc-scFv-Format ausgeprägt war. Im Zytotoxizitätsassay konnte die Funktionalität der verschiedenen mono- und bispezifischen Konstrukte sowie eine Verstärkung der Zelllyse durch den ADCC-optimierten Fc-Teil nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine grundlegende Eignung der analysierten mono- und bispezifischen Antikörper für die Weiterentwicklung im Zusammenhang mit therapeutischen Zwecken hin.



## 2 Summary

The use of monoclonal antibodies represents an important and effective option for the diagnosis and therapy of cancer. During the nineties of the last century, the development of new genetic engineering methods allowed the generation of antibodies from fully human genes. Furthermore, new screening and engineering methods enabled the creation of a new antibody generation with a variety of formats, improved characteristics with simultaneously reduced immunogenicity. The generation and application of bispecific antibodies, that recognise two tumor associated antigens or a tumor associated antigen and an effector antigen, comprises a promising approach for therapeutics.

The aim of this work was the characterization of human monoclonal antibodies against the tumor associated antigen CEA and the effector antigen NKG2D in different mono- and bispecific formats with regards to antigen specificity, aggregation tendency and functionality.

Based on scFv fragments that were selected from antibody gene libraries using phage display and panning, and by using a cassette based vector system, several antibodies were generated in different formats and produced successfully. The different formats comprised scFv-Fc, IgG, scFv-Fc-scFv und IgG-scFv antibodies partially including an ADCC optimized Fc part. The generated antibodies bound specifically to their antigen and one CEA specific antibody showed avidity effects during antigen binding. The aggregation tendency of the antibodies varied greatly depending on the used format. IgG antibodies showed the lowest aggregation tendency while scFv-Fc-scFv antibodies were more prone to dimerization. Several generated mono- and bispecific antibodies were functional in a cytotoxicity assay and enhanced cell lysis due to presence of the ADCC optimized Fc part.

Taken together, the results indicate that the analyzed mono- and bispecific antibodies may be suitable for further developments towards therapeutic use.





## 3 Einleitung

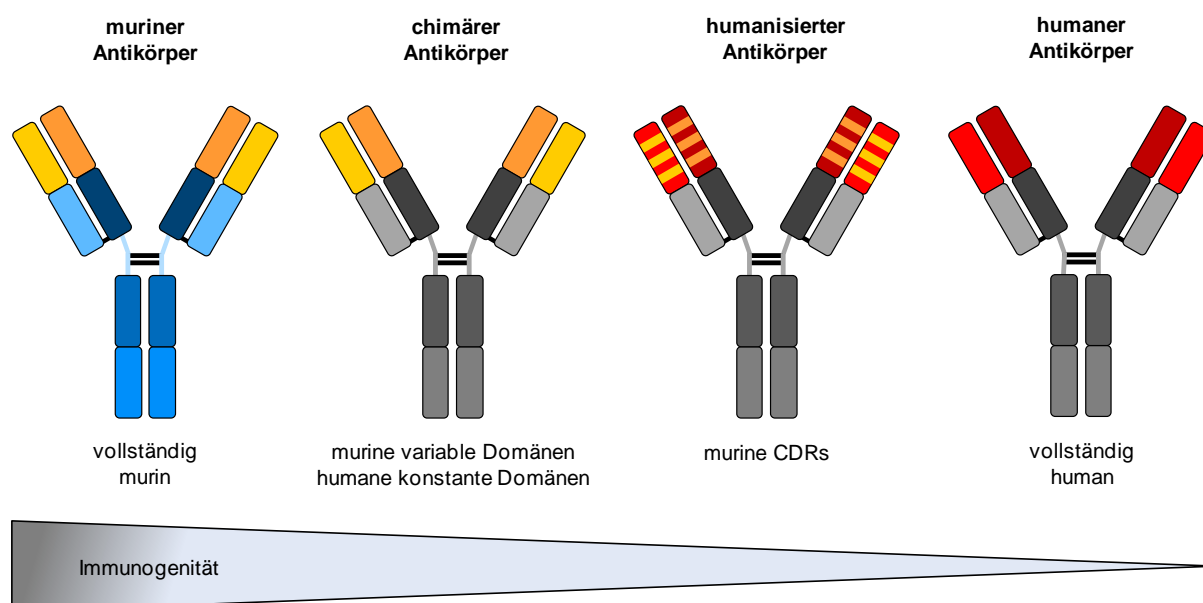
### 3.1 Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie

In den 1970ern entwickelten Georges Köhler und César Milstein mit der Hybridomtechnologie die erste verlässliche Möglichkeit, monoklonale Antikörper mit gleicher Antigenspezifität zu gewinnen (Köhler & Milstein, 1975). Ausgehend von dieser bahnbrechenden Methode begann zeitnah die Entwicklung therapeutischer Antikörper. 1986 wurde der erste Antikörper dieser Generation Muromonab (Handelsname Orthoclone OKT-3<sup>®</sup>), ein CD3-spezifischer muriner Immunglobulin G 2a (IgG2a)-Antikörper zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen, von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen (Ortho Multicenter Transplant Study Group, 1985). Murine Antikörper stellten sich jedoch in der klinischen Entwicklung als hoch immunogen heraus und verursachten starke Nebenwirkungen (Sgro, 1995). Die wiederholte Gabe der Antikörper führte zur Bildung neutralisierender Antikörper durch den Patienten und damit zur Unwirksamkeit der Behandlung (HAMA, *Human anti-mouse antibody*; Courtenay-Luck *et al*, 1986; Tjandra *et al*, 1990). Weitere Probleme stellten die ineffiziente Aktivierung von Effektorfunktionen, bedingt durch den murinen Fc-Teil (*Fragment crystallizable/constant*) und die kurze Halbwertszeit der Antikörper dar (Glennie & Johnson, 2000; Ober *et al*, 2001). Um die Effizienz zu erhöhen und die unerwünschten Nebeneffekte zu reduzieren, wurden die Antikörper mit Hilfe neuer Techniken wie der Chimärisierung und Humanisierung weiterentwickelt. Die Chimärisierung von Antikörpern beinhaltet den Austausch der murinen gegen humane konstante Domänen (Boulianne *et al*, 1984; Morrison *et al*, 1984). Bei der Humanisierung werden nur die murinen CDRs (*Complementarity determining regions*) beibehalten und in ein humanes Antikörpergerüst eingefügt (Jones *et al*, 1986; Riechmann *et al*, 1988). Als erfolgreiche Beispiele sind hier der 1997 von der FDA zugelassene chimere IgG1-Antikörper Rituximab (Handelsname Rituxan<sup>®</sup>, MabThera<sup>®</sup>) und der 1998 zugelassene humanisierte IgG1 Trastuzumab (Handelsname Herceptin<sup>®</sup>) zu nennen (Coiffier, 2007; Nahta & Esteva, 2007). Der CD20-spezifische Antikörper Rituximab wird für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt. Der

HER2-spezifische Antikörper Trastuzumab ist für die Behandlung von Brust- und Magenkrebs zugelassen. (Vacchelli *et al*, 2014)

Ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung therapeutischer Antikörper stellte Anfang der 1990er die Generierung vollständig humaner Antikörper durch zwei neue Technologien - transgene Mäuse und das Phagendisplay - dar. Transgene Mäuse tragen das humane Antikörpergenrepertoire. Nach der Immunisierung der Mäuse können mit Hilfe der Hybridomtechnologie humane Antikörper produziert werden. (Jakobovits, 1995; Lonberg, 2005) Das Phagendisplay ermöglicht die immunisierungsfreie *in vitro* Selektion Antigen-spezifischer Antikörperfragmente, die anschließend in andere Formate überführt werden können (Hoogenboom, 2005; Schirrmann *et al*, 2011). Der erste therapeutische Antikörper dieser Generation war der 2001 zugelassene TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* )-spezifische IgG1-Antikörper Adalimumab (Handelsname Humira<sup>®</sup>). Adalimumab wurde mittels Phagendisplay generiert und wird bei entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn eingesetzt. (Rau, 2002; Asgharpour *et al*, 2013) In den Folgejahren wurden auch humane Antikörper für die Krebstherapie entwickelt, wie z. B. der EGFR (*Epidermal growth factor receptor*)-spezifische IgG2-Antikörper Panitumumab (Handelsname Vectibix<sup>®</sup>, bei kolorektalem Karzinom) oder der CD20-spezifische IgG1-Antikörper Ofatumumab (Handelsname Arzerra<sup>®</sup>, bei chronischer lymphatischer Leukämie; (Moroni *et al*, 2005; Wierda *et al*, 2010). Beide Antikörper wurden aus transgenen Mäusen entwickelt (Yang *et al*, 2001; Teeling *et al*, 2004).

Durch die Entwicklung vollständig humaner Antikörper konnten die Immunogenität und damit die Nebenwirkungen der Therapie deutlich verringert, aber nicht eliminiert werden (siehe Abbildung 3.1). Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst das immunogene Potential: Die Glykosylierung der rekombinant hergestellten Antikörper oder auch die verwendeten CDRs können vom Immunsystem des Patienten als körperfremd erkannt werden. Der Immunstatus des Patienten sowie genetische Faktoren spielen ebenso eine wichtige Rolle. Hinzu kommen die Galenik des Therapeutikums und die Art des Zielproteins selbst (zellgebunden, löslich oder Immunzelle). (Sauerborn, 2014) Die Verringerung der Immunogenität sowie die Erhöhung der Effektivität der Antikörper führten neben der Humanisierung und Generierung humaner Antikörper zu einer vielfältigen Weiterentwicklung und Modifikation z.B. durch Veränderung des Glykosylierungsmusters, der Affinität und Avidität, oder der Molekülgröße (Scott *et al*, 2012; Sauerborn, 2014).



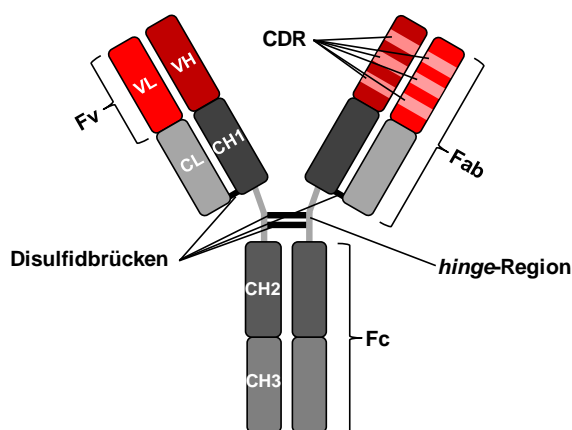
**Abbildung 3.1 Verringerung der Immunogenität von Antikörpern durch Chimerisierung und Humanisierung**

Der Austausch der konstanten Domänen eines Maus-Antikörpers, der z.B. mittels Hybridomtechnologie generiert wurde, führt zu einer Verringerung der Immunogenität (chimärer Antikörper). Die Immunogenität kann weiter verringert werden, indem nur die murinen CDRs (*Complementarity determining regions*) beibehalten werden und in ein humanes Antikörpergerüst eingefügt werden (humanisierter Antikörper). Humane Antikörper, die keinerlei murine Bestandteile besitzen, zeigen im Allgemeinen die geringste Immunogenität (modifiziert nach Sauerborn, 2014).

### 3.1.1 Therapiestrategien und Antikörperformate

Bisher wurden für die Krebstherapie hauptsächlich Antikörper im IgG-Format zugelassen (siehe Abbildung 3.2). Dabei dominiert die Anzahl humanisierter und humaner Antikörper (siehe Tabelle 3.1). Neben der Monotherapie mit Antikörpern findet häufig die Kombination mit Chemotherapeutika Anwendung. Zum Beispiel wird Trastuzumab in Kombinationstherapien mit Doxorubicin, Cyclophosphamid, Paclitaxel, Docetaxel oder Carboplatin eingesetzt (Genentech, Inc., 2015). Möglich ist auch der Einsatz als adjuvante Therapie nach Operationen, Chemotherapien oder Strahlentherapien, um Mikrometastasen oder verbliebene Tumorzellen zu entfernen (Thomas *et al*, 2003; Baselga *et al*, 2006).

Bei der Entwicklung neuer Antikörper-basierter Therapien werden eine Vielzahl an Strategien verfolgt. Eine Möglichkeit ist die direkte Wirkung des Antikörpers durch die Bindung des Zielproteins. Über den Fc-Teil der Antikörper können Effektorfunktionen des Immunsystems aktiviert werden. Zudem eignen sie sich zum gezielten Transport von zytotoxischen Substanzen. Verbunden mit der Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten ist auch die Entwicklung verschiedener Antikörperformate.



**Abbildung 3.2 Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G Antikörpers (IgG)**

VL und VH: variable Domänen der leichten und schweren Kette; CL, CH1, CH2, CH3: konstante Domänen der leichten und schweren Kette; Fv: *Fragment variable*, Antigen-bindender Bereich; Fab: *Fragment antigen binding*; CDR: *Complementarity determining region*; Hinge-Region: flexibler Bereich zwischen CH1 und CH2-Domäne der schweren Kette; Fc: *Fragment crystallizable/constant*, Bereich mit Effektorfunktion

**Tabelle 3.1 Von der FDA für die Behandlung von Krebs zugelassene Antikörper (Stand Februar 2019)**

Antikörper (Handelsname)	Typ	Target	Indikation	1. Zulassung
<b>Unkonjugierte Antikörper</b>				
<b>Rituximab (Rituxan®)</b>	chimärer IgG1	CD20	Verschiedene Leukämien und Lymphome	1997
<b>Trastuzumab (Herceptin®)</b>	humanisierter IgG1	HER2	Brustkrebs, Magen- und Speiseröhrenkrebs	1998
<b>Alemtuzumab (Campath®)</b>	humanisierter IgG1	CD52	CLL	2001
<b>Cetuximab (Erbix®)</b>	chimärer IgG1	EGFR	Kopf-Hals-Karzinom, Kolorektales Karzinom, Lungenkrebs	2004
<b>Bevacizumab (Avastin®)</b>	humanisierter IgG1	VEGF	Kolorektales, zervikales und ovariales Karzinom, NSCLC, Glioblastom, Nierenkrebs	2004
<b>Panitumumab (Vectibix®)</b>	humaner IgG2	EGFR	Kolorektales Karzinom, Pankreaskarzinom	2006
<b>Ofatumumab (Arzerra®)</b>	humaner IgG1	CD20	CLL/NHL	2009
<b>Denosumab (Xgeva®)</b>	humaner IgG2	RANKL	Riesenzelltumore des Knochens	2010
<b>Ipilimumab (Vervoy®)</b>	humaner IgG1	CTLA-4	Melanom	2011
<b>Pertuzumab (Perjeta®)</b>	humanisierter IgG1	HER2	Brustkrebs, Magen- und Speiseröhrenkrebs, Neuroendokrine Tumore	2012

Antikörper (Handelsname)	Typ	Target	Indikation	1. Zulassung
<b>Unkonjugierte Antikörper</b>				
<b>Obinutuzumab (Gazyva®)</b>	humanisierter IgG1	CD20	CLL/NHL	2013
<b>Ramucirumab (Cyramza®)</b>	humaner IgG1	VEGFR2	Brust- und Magenkrebs, NSCLC, Leber- und Nierenkrebs	2014
<b>Nivolumab (Opdivo®)</b>	humaner IgG4	PD-1	Melanom, NSCLC	2014
<b>Pembrolizumab (Keytruda®)</b>	humanisierter IgG4	PD-1	Melanom, NSCLC	2014
<b>Siltuximab (Sylvant®)</b>	chimärer IgG1	IL-6	Morbus Castleman	2014
<b>Dinutuximab (Unituxin®)</b>	chimärer IgG1	GD2	Hochrisiko-Neuroblastom	2015
<b>Elotuzumab (Empliciti®)</b>	humanisierter IgG1	SLAMF7	Multiples Myelom	2015
<b>Daratumumab (Darzalex®)</b>	humaner IgG1	CD38	Multiples Myelom	2015
<b>Necitumumab (Portrazza®)</b>	humaner IgG1	EGFR	NSCLC	2015
<b>Atezolizumab (Tecentriq®)</b>	humanisierter IgG1	PD-L1	Urotheliales metastatisches Karzinom, NSCLC	2016
<b>Olaratumab (Lartruvo®)</b>	humaner IgG1	PDGFR $\alpha$	Weichteilsarkom	2016
<b>Avelumab (Bavencio®)</b>	humaner IgG1	PD-L1	metastatisches Merkelzellkarzinom	2017
<b>Durvalumab (Imfinzi®)</b>	humaner IgG1	PD-L1	Urotheliales Karzinom	2017
<b>Bevacizumab-awwb (Mvasi®)</b>	Biosimilar zu Bevacizumab	VEGF	Kolorektales, renales und zervikales Karzinom, NSCLC, Glioblastom	2017
<b>Trastuzumab-dkst (Ogivri®)</b>	Biosimilar zu Trastuzumab	HER2	Brustkrebs, Magenkrebs	2017
<b>Trastuzumab-pkrb (Herzuma®)</b>	Biosimilar zu Trastuzumab	HER2	Brustkrebs	2018
<b>Cemiplimab-rwlc (Libtayo®)</b>	humaner IgG4	PD-1	Plattenepithelkarzinom	2018
<b>Mogamulizumab-kpkc (Poteligeo®)</b>	humanisierter IgG1	CCR4	Mycosis fungoides, Sézary Syndrom	2018
<b>Rituximab-abbs (Truxima®)</b>	Biosimilar zu Rituximab	CD20	Non-Hodgkin-Lymphom	2018
<b>Trastuzumab-dttb (Ontruzant®)</b>	Biosimilar zu Trastuzumab	HER2	Brustkrebs, Magenkrebs	2019
<b>Bispezifische Antikörper</b>				
<b>Blinatumomab (Blinicyto®)</b>	muriner BiTE®	CD19/CD3	B-Zell ALL	2014
<b>Kombinationstherapie</b>				
<b>Rituximab und humane Hyaluronidase (Rituxan Hycela®)</b>	chimärer IgG1 mit humaner Hyaluronidase	CD20	verschiedene Lymphome	2017
<b>Immunkonjugate</b>				
<b>Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)</b>	humanisierter IgG4 (Calicheamicin)	CD33	AML	2000
<b>Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®)</b>	muriner IgG1 ( <sup>90</sup> Y)	CD20	NHL	2002
<b>Brentuximab vedotin (Adcetris®)</b>	chimärer IgG1 (MMAE)	CD30	Hodgkin-Lymphom, SALCL	2011
<b>Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®)</b>	humanisierter IgG1 (DM1)	HER2	Brustkrebs	2013

Antikörper (Handelsname)	Typ	Target	Indikation	1. Zulassung
<b>Immunkonjugate</b>				
<b>Inotuzumab ozogamicin (Besponsa®)</b>	humanisierter IgG4 (Calicheamicin)	CD22	B-Zell ALL	2017
<b>Moxetumomab Pasudotox-tfdk (Lumoxiti®)</b>	murines Fv (P. aeruginosa Exotoxin A)	CD22	Haarzellleukämie	2018

CLL: Chronische lymphatische Leukämie, NHL: Non-Hodgkin-Lymphom, NSCLC: Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, ALL: Akute lymphoblastische Leukämie, AML: Akute myeloische Leukämie, SALCL: Systemisches anaplastisch-großzelliges Lymphom, MMAE: Monomethyl auristatin E, DM1: Mertansin (nach Redman *et al*, 2015; Kimiz-Gebologlu *et al*, 2018; Arlotta & Owen, 2019; Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017) – ACTIP website; Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products, 2019)

### 3.1.1.1. Direkte Wirkung durch Antigenbindung

Die direkte Wirkung eines therapeutischen Antikörpers besteht in der Unterbrechung oder Manipulation von Signalwegen, was zur Inhibition der Proliferation oder zur Apoptose der Tumorzellen führt. Durch die Bindung an Rezeptoren kann die Interaktion mit Liganden, die Homo- und Heterodimerisierung sowie die Phosphorylierung oder Internalisierung von Rezeptoren gehemmt werden. Der chimere EGFR-spezifische Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux®) blockiert durch Bindung an den EGF-Rezeptor die Bindung des Liganden, die Dimerisierung sowie die Phosphorylierung des Rezeptors (Li *et al*, 2005; Patel *et al*, 2009). Die Unterbrechung der Signalkaskade führt zum Arrest im Zellzyklus und letztendlich zur Apoptose der Tumorzellen (Shuptrine *et al*, 2012). Andere Antikörper binden an Liganden und unterbinden so die Interaktion des Liganden mit seinem Rezeptor. Denosumab, ein humaner IgG2-Antikörper, bindet an den Liganden RANKL (*Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*) und hemmt so die Bindung des Liganden an den Rezeptor RANK (*Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B*; Roux *et al*, 2002; Chawla *et al*, 2013). Die Inhibition von RANKL reduziert den Knochenab- und -umbau bei Osteoporose (Handelsname Prolia®) und Riesenzelltumoren des Knochens (Handelsname Xgeva®; Cummings *et al*, 2009; Chawla *et al*, 2013).

Neben direkt auf Tumorzellen befindlichen Antigenen sind Antigene im Tumor-assoziierten Gefäßsystem und dem Stroma therapeutisch relevante Zielstrukturen. Die Angiogenese ist ein wichtiger Faktor für die Proliferation von Tumorzellen und das Wachstum von Tumoren. Der humanisierte Antikörper Bevacizumab (Handelsname Avastin®) bindet spezifisch an den von Tumorzellen stark exprimierten pro-angiogenetischen Faktor VEGF-A (*Vascular endothelial*

*growth factor-A*), wodurch die Bindung des Liganden an den Rezeptor VEGFR-2 (*Vascular endothelial growth factor receptor-2*) und damit die Angiogenese blockiert wird (Sullivan & Brekken, 2010).

### **3.1.1.2. Direkte Wirkung durch Immunmodulation**

Therapeutische Antikörper können auch genutzt werden, um immunologische Signalwege zu aktivieren oder zu inhibieren. Ein Beispiel ist die Blockierung des auf T-Zellen exprimierten Rezeptors CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) durch Antikörper wie Ipilimumab (Handelsname Vervoy®) oder Tremelimumab (Buchbinder & McDermott, 2015). Die Interaktion des Rezeptors mit den Liganden CD80 oder CD86, die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, führt zur Gegenregulation aktivierender Signale in T-Zellen (Redman *et al*, 2015). Die Blockierung von CTLA-4 durch Antikörper führt zur Aktivierung von Effektor-T-Zellen und zur Depletion regulatorischer T-Zellen (Peggs *et al*, 2009; Buchbinder & McDermott, 2015).

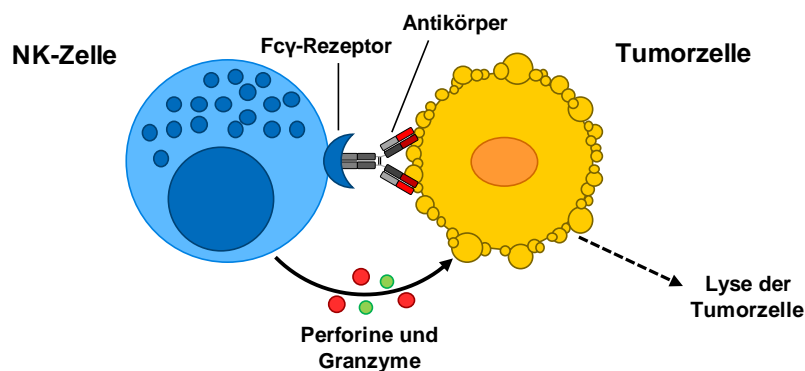
Einen weiteren Ansatzpunkt für therapeutische Antikörper bilden der PD-1 Rezeptor (*Programmed death receptor-1*) und dessen Ligand PD-L1 (Redman *et al*, 2015). Der Rezeptor wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und führt nach Bindung der Liganden PD-L1 oder PD-L2 zur Inhibierung der T-Zell-Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung (Keir *et al*, 2008; Robert *et al*, 2014). Der Ligand PD-L1 wird häufig von Tumorzellen exprimiert, um eine T-Zellantwort zu supprimieren (Robert *et al*, 2014). Verschiedene Antikörper, die den Rezeptor PD-1 oder den Liganden PD-L1 als Target haben, befinden sich bereits in der klinischen Anwendung (z.B. Nivolumab, Handelsname Opdivo® oder Atezolizumab, Handelsname Tecentriq®; siehe Tabelle 3.1). Weitere Therapieansätze basieren auf agonistischen Antikörpern, die aktivierende Rezeptoren auf Effektorzellen binden. In klinischen Studien befinden sich u.a. Antikörper, die an die Rezeptoren CD40, GITR (*Glucocorticoid induced TNF receptor family related gene*), OX40 oder 4-1BB binden (Vonderheide *et al*, 2013; Schaer *et al*, 2014).

### **3.1.1.3. Indirekte Wirkung durch Fc-vermittelte Effektorfunktionen**

Neben direkten Effekten, die durch die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen ausgelöst werden, können über den Fc-Teil andere Komponenten des Immunsystems rekrutiert und

aktiviert werden. Dabei ist die Aktivierung vom Antikörpertyp und den Rezeptoren auf der Oberfläche der Effektorzellen bzw. gebundenen Effektormolekülen abhängig. In der Tumorthherapie werden hauptsächlich Antikörper des IgG-Isotyps IgG1 eingesetzt. IgG1-Antikörper zeichnen sich durch ihre Langzeitstabilität und die effektive Aktivierung von Effektorfunktionen wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC; Clark, 1997) sowie die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) aus. Von den übrigen Isotypen ist der Isotyp IgG3 ebenfalls in der Lage ADCC, CDC und ADCP auszulösen, wohingegen der Isotyp IgG4 nur ineffizient Effektorfunktionen aktivieren kann. Der Isotyp IgG2 kann nur ADCC initiieren und führt hierbei zur Aktivierung myeloider Zellen wie z.B. Neutrophile und Monozyten als Effektorzellen (Schneider-Merck *et al*, 2010).

Beim ADCC interagiert der Fc-Teil des Antikörpers nach der Antigenbindung auf der Tumorzelle mit aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren vom Typ Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) auf der Oberfläche von NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Die Aktivierung der NK-Zellen führt zur Freisetzung von Effektormolekülen wie Perforinen und Granzym B (siehe Abbildung 3.3). Die Polymerisierung von Perforinen in der Zellmembran der Zielzelle mündet in der Ausbildung von Poren und dem Verlust der Integrität der Zellmembran. Die Serinprotease Granzym B induziert DNA-Schäden, welche zur Apoptose der Zielzelle führen. (Schenk *et al*, 2016)



**Abbildung 3.3 Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)**

Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) wird durch die Erkennung von IgG-markierten Tumorzellen über Fc $\gamma$ -Rezeptoren, welche von Effektorzellen wie NK-Zellen exprimiert werden, initiiert. Die Freisetzung von Effektormolekülen wie Perforinen und Granzymen durch die Effektorzelle führt anschließend zur Apoptose der Tumorzelle. (Abbildung modifiziert nach Weiner *et al*, 2010)



Der Rezeptor FcγRIIIa (CD16a) ist neben NK-Zellen auch auf dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen zu finden. Die Bedeutung der Effektorzellrekrutierung für den therapeutischen Erfolg eines Antikörpers wurde in klinischen Studien zu den Antikörpern Rituximab, Trastuzumab und Cetuximab demonstriert (Cartron *et al*, 2002; Dall'Ozzo *et al*, 2004; Gennari *et al*, 2004; Bibeau *et al*, 2009). Untersucht wurde z.B. der Einfluss von Polymorphismen im Fcγ-Rezeptor FcγRIIIa auf den Erfolg der Therapie mit Rituximab. Patienten des Allotyps FcγRIIIa-V158, der zu einer höheren Affinität des Rezeptors zum Fc-Teil des Antikörpers führt, zeigten in verschiedenen Studien eine bessere klinische Antwort, als Patienten des Allotyps FcγRIIIa-F158 (Cartron *et al*, 2002).

Der Fc-Teil von Antikörpern kann auch von anderen Rezeptoren aus der Familie der Fcγ-Rezeptoren gebunden werden. Der aktivierende Fcγ-Rezeptor FcγRI (CD64) wird von Makrophagen, Dendritische Zellen, Neutrophilen und Eosinophilen exprimiert (Nimmerjahn & Ravetch, 2006). Nach der Bindung von Antikörpern an Tumorzellen kann die Interaktion der Fc-Teile mit dem hoch-affinen Fcγ-Rezeptor FcγRI (CD64) zur Phagozytose der Tumorzellen führen (Redman *et al*, 2015). Möglich ist auch eine Interaktion der Antikörper mit dem inhibitorischen Fcγ-Rezeptor FcγRIIb (CD32b) auf der Oberfläche von B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Basophilen, Neutrophilen und Mastzellen (Smith & Clatworthy, 2010). Studien zum Antikörper Rituximab ließen einen Zusammenhang zwischen der Internalisierung des Antikörpers durch die Bindung an den inhibitorischen Fcγ-Rezeptor und eine reduzierte Effektivität der Therapie vermuten (Lim *et al*, 2011; Lee *et al*, 2015).

Die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) wird durch Interaktion von Antikörpern mit Bestandteilen des Komplementsystems ausgelöst. Nach der Antigenbindung auf der Oberfläche der Tumorzelle, binden C1q Untereinheiten des Komplement-Faktors 1 (C1) an die Fc-Teile der Antikörper. Nur wenn mehrere IgG-Moleküle von C1q gebunden wurden, führt dies zur Aktivierung der enzymatisch aktiven Untereinheiten von C1 und zur klassischen Komplementkaskade. Diese mündet in der Ausbildung von Poren in der Zellmembran der Tumorzelle durch den Membranangriffskomplex (MAC) und zur Zelllyse (Weiner *et al*, 2010). Die Bedeutung des CDC für die Therapie konnte bisher nicht abschließend in klinischen Studien geklärt werden. Präklinische Studien u.a. mit Rituximab, Alemtuzumab oder Daratumumab deuten aber darauf hin, dass CDC zur Lyse von

Tumorzellen und somit zum Erfolg der Behandlung beiträgt (Gaetano *et al*, 2003; Golay *et al*, 2004; Weers *et al*, 2011).

Fc-vermittelte Effektorfunktionen scheinen noch über einen weiteren indirekten Mechanismus den Erfolg der Therapie zu beeinflussen. Studien zum Antikörper Rituximab zeigten, dass der maximale klinische Erfolg erst Monate nach der Behandlung eintrat (Cartron *et al*, 2004). Wahrscheinlich kommt es initiiert durch ADCC und CDC zur Kreuzpräsentation von Tumorantigenen in MHC I- und MHC II-Komplexen (*Major histocompatibility complex*) auf dendritischen Zellen. Diese Präsentation führt zur Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zerstören die Tumorzellen direkt, während CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen körpereigene B-Zellen zur Produktion Antigen-spezifischer Antikörper veranlassen (Berard *et al*, 2000; Dhodapkar *et al*, 2002; Weiner *et al*, 2010; Redman *et al*, 2015).

#### **3.1.2 "Next Generation"-Antikörper in der Krebstherapie**

Aufgrund der Stabilität, Vielseitigkeit und pharmakologischen Eigenschaften basierten therapeutische Antikörper bisher hauptsächlich auf dem IgG-Format. Die Entwicklung neuer *Screening*- und *Engineering*-Technologien ermöglicht die Schaffung einer neuen Antikörpergeneration - auch "*Biobetters*" genannt - mit verbesserten Eigenschaften, verstärkten oder neuen therapeutischen Effekten bei gleichzeitig reduzierter Immunogenität. (Arlotta & Owen, 2019; Elgundi *et al*, 2017)

##### **3.1.2.1. Modifikation von therapeutischen Antikörpern**

Ein Ansatzpunkt für die Verbesserung von therapeutischen Antikörpern ist deren Modifikation durch Affinitätsreifung oder Veränderung des Fc-Teils. Ko und Kollegen erreichten durch Affinitätsreifung eines HER2-spezifischen Antikörpers eine Verstärkung des anti-proliferativen Effekts *in vitro* und eine Inhibierung des Tumorwachstums im Maus-Xenograft-Modell vergleichbar mit der Effektivität von Trastuzumab (Ko *et al*, 2015). Die Erhöhung der Affinität eines therapeutischen Antikörpers kann aber auch im Fall von soliden Tumoren zu einer schlechteren Tumorpenetration führen, ein Effekt, der als "*Binding site barrier*" beschrieben wird (Juweid *et al*, 1992).

Die Änderung des Glykosylierungsmusters des Fc-Teils, das sogenannte *Glycoengineering*, kann zu einer Verbesserung der Effektorfunktion von Antikörpern führen. Erste Antikörper mit verändertem Glykosylierungsmuster wurden bereits zugelassen. So handelt es sich bei Obinutuzumab (Handelsname Gazyva<sup>®</sup>) um einen humanisierten Antikörper bei dem durch Afukosilierung des Fc-Teils die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) verstärkt wurde (Ratner, 2014; Kakkar & Balakrishnan, 2015). Mutationen der Aminosäuren im Fc-Teil können die Affinität zum neonatalen Fc-Rezeptor FcRn erhöhen und somit zu einer verlängerten Halbwertszeit des Antikörpers beitragen (Robbie *et al*, 2013) oder die Bindung an den aktivierenden Rezeptor FcγRIIIa (CD16a) verbessern während die Bindung an den inhibitorischen Rezeptor FcγRIIb (CD32b) verringert wird, was zu Verstärkung der ADCC führt (Lazar *et al*, 2006).

Ein weiteres Ziel bei der Entwicklung neuer therapeutischer Antikörper ist die Verringerung der Immunogenität. Neben der Humanisierung bzw. Nutzung vollständig humaner Antikörper (Sauerborn, 2014; Abbildung 3.1) ist ein Ansatz, das immunogene Potential der Antikörper durch die Entfernung T-Zell-stimulierender Epitope zu senken (Harding *et al*, 2010). Des Weiteren sind die Veränderung von Glykosylierungsmustern (Sauerborn, 2014) und Verringerung der Aggregationsneigung (Kumar *et al*, 2011) aussichtsreiche Methoden zur Senkung der Immunogenität.

Darüber hinaus spielt auch die Bioverfügbarkeit bzw. Formulierung des Therapeutikums eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Behandlung. Meist erfolgt die Gabe von therapeutischen Antikörpern intravenös. Um die Behandlung des Patienten zu vereinfachen, werden Formulierungen entwickelt, die subkutan, intramuskulär oder oral verabreicht werden können. Für eine optimale Bioverfügbarkeit müssen Antikörper dabei eine hohe Löslichkeit und möglichst geringe Neigung zur Aggregation aufweisen. Durch die Verwendung von Polymeren als Matrixsysteme können außerdem die kontrollierte Freigabe des Antikörpers und ein verbessertes pharmakokinetisches Profil erreicht werden. (Elgundi *et al*, 2017)

### **3.1.2.2. Immunkonjugate**

Eine weitere Strategie zur Antikörper-basierten Behandlung von Krebs bilden Immunkonjugate. Hierbei dienen Antikörper als Vehikel für zytotoxische Substanzen, wie Arzneistoffe, Radionuklide oder Toxine. Durch eine zielgerichtete Wirkung dieser Substanzen wird die Therapie effektiver gestaltet und die Schädigung gesunden Gewebes

deutlich verringert. Immunkonjugate bestehen aus drei separaten Komponenten: einem Antikörper, der zytotoxischen Substanz und einem Linker, der beide Komponenten miteinander verbindet (Smaglo *et al*, 2014). Auf Grund der gut beschriebenen strukturellen sowie pharmakologischen Eigenschaften von Antikörpern im IgG-Format und des Einsatzes in der Krebstherapie, werden diese auch in der Entwicklung von Immunkonjugaten verwendet (Smaglo *et al*, 2014). Für die Therapie zugelassen wurden bereits Konjugate wie Ado-trastuzumab emtansine (Handelsname Kadcyla<sup>®</sup>) aus dem humanisierten Antikörper Trastuzumab und dem Mikrotubuli-Inhibitor DM1 oder das Radiokonjugat Ibritumomab Tiuxetan (Handelsname Zevalin<sup>®</sup>) aus dem murinen Antikörper Ibritumomab und dem Isotop Yttrium-90 (FDA: BLA 125427 Suppl-104; KADCYLA, labeling information; FDA: BLA 125019 Suppl-227; ZEVALIN, labeling information; siehe Tabelle 3.1).

Neben IgG-basierten Konstrukten befinden sich auch Immunkonjugate auf Grundlage von Antikörperfragmenten in der Entwicklung, da die geringere Größe eine bessere Durchdringung von soliden Tumoren ermöglicht, jedoch reduziert sich gleichzeitig die pharmakokinetische Halbwertszeit dieser Konstrukte. (Wu & Senter, 2005)

Eine weitere Verbesserung der Selektivität von Immunkonjugaten stellt das ADEPT (*Antibody-directed enzyme prodrug therapy*) Konzept dar. Hierbei wird der tumorspezifische Antikörper mit einem Enzym gekoppelt, welches in einer zweiphasigen Therapie nach Gabe des Antikörper-Enzym Konjugats im ersten Schritt und einer nicht-toxischen Vorstufe im zweiten Schritt, die Vorstufe in ein Toxin umsetzt. Somit wird eine gezielte Toxinwirkung im Bereich des Tumors erreicht. (Mishra *et al*, 2018)

#### **3.1.2.3. Alternative Antikörperformate**

Parallel zur Weiterentwicklung IgG-basierter monoklonaler Antikörper werden verschiedene Ansätze zur Generierung von IgG-Derivaten und alternativen Gerüststrukturen verfolgt. Die Verwendung von kleineren IgG-Fragmenten wie Fab-Fragmenten (*Fragment antigen binding*), oder scFv-Fragmenten (*Single chain fragment variable*) ermöglichen eine bessere Durchdringung des Tumorgewebes, während die Antigenspezifität erhalten bleibt. Das Fehlen von Effektorfunktionen und eine kürzere Halbwertszeit können ebenfalls vorteilhaft für bestimmte therapeutische Anwendungen z.B. in der Radioimmuntherapie sein (Überblick in Martins *et al*, 2018). Die deutlich kürzere Halbwertszeit von Antikörperfragmenten führt aber im Fall von soliden Tumoren zu einer verringerten Aufnahme in das Tumorgewebe, was der

verbesserten Durchdringung des Gewebes entgegen wirkt (Chames *et al*, 2009). Um die Halbwertszeit zu erhöhen und so die Häufigkeit, mit der ein therapeutischer Antikörper verabreicht werden muss, sowie die Dosis zu reduzieren, werden Antikörperfragmente z.B. PEGyliert, mit humanem Serumalbumin fusioniert, glykosiliert oder multimerisiert (Chames *et al*, 2009; Kontermann, 2011). Fusionsproteine aus Antikörperfragment und Fc-Teil vereinen die Vorteile aus einer geringeren Größe verglichen mit einem IgG und der Nutzung von Effektorfunktionen.

Derzeit befinden sich verschiedene Antikörperfragmente für die Krebstherapie in präklinischen und klinischen Studien. So wird Otlertuzumab ein CD37-spezifischer humanisierter Antikörper bestehend aus einem scFv-Fragment welches mit einem Fc-Teil fusioniert wurde (SMIP; *Small modular immunopharmaceutical*) in klinischen Studien zur Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie getestet (Byrd *et al*, 2014; Wendtner, 2014)

Alternative Antikörperformate bieten neben der Möglichkeit Antigene bi- oder multivalent zu binden auch das Potential zeitgleich verschiedene Antigene zu binden. Einen vielversprechenden und bereits weit entwickelten Ansatz bilden bispezifische Antikörper verschiedenster Formate.

### **3.1.3 Bispezifische Antikörper**

Krebs ist eine multifaktorielle Erkrankung, daher kann es unter Umständen für die Therapie nicht ausreichend sein, nur ein Tumor-assoziiertes Antigen durch monoklonale Antikörper zu binden bzw. einen pathogenetischen Signalweg zu unterbrechen. Durch bispezifische Antikörper ist es möglich 1) Effektorzellen, wie T-Zellen oder NK-Zellen zu rekrutieren und so die Lyse bzw. Apoptoserate von Tumorzellen zu erhöhen, 2) gleichzeitig zwei verschiedene eigenständige oder überlappende pathogene Signalwege zu blockieren, 3) potenziell die Spezifität für die Bindung an Tumorzellen zu erhöhen, indem zwei verschiedene Antigene auf der Zelloberfläche gebunden werden (Fan *et al*, 2015).

Die Anfänge der Entwicklung bispezifischer Antikörper reichen zurück bis in die 1960er Jahre als Nisonoff und Rivers 1961 Fab-Fragmente zweier polyklonaler Seren zu bispezifischen Molekülen re-assoziierten (Nisonoff & Rivers, 1961). Der nächste große Schritt gelang in den 1970er und 1980er Jahren mit der Etablierung der Hybridomtechnologie und der Fusion zweier Antikörper-produzierender Hybridomzelllinien zu Hybrid-Zelllinien,

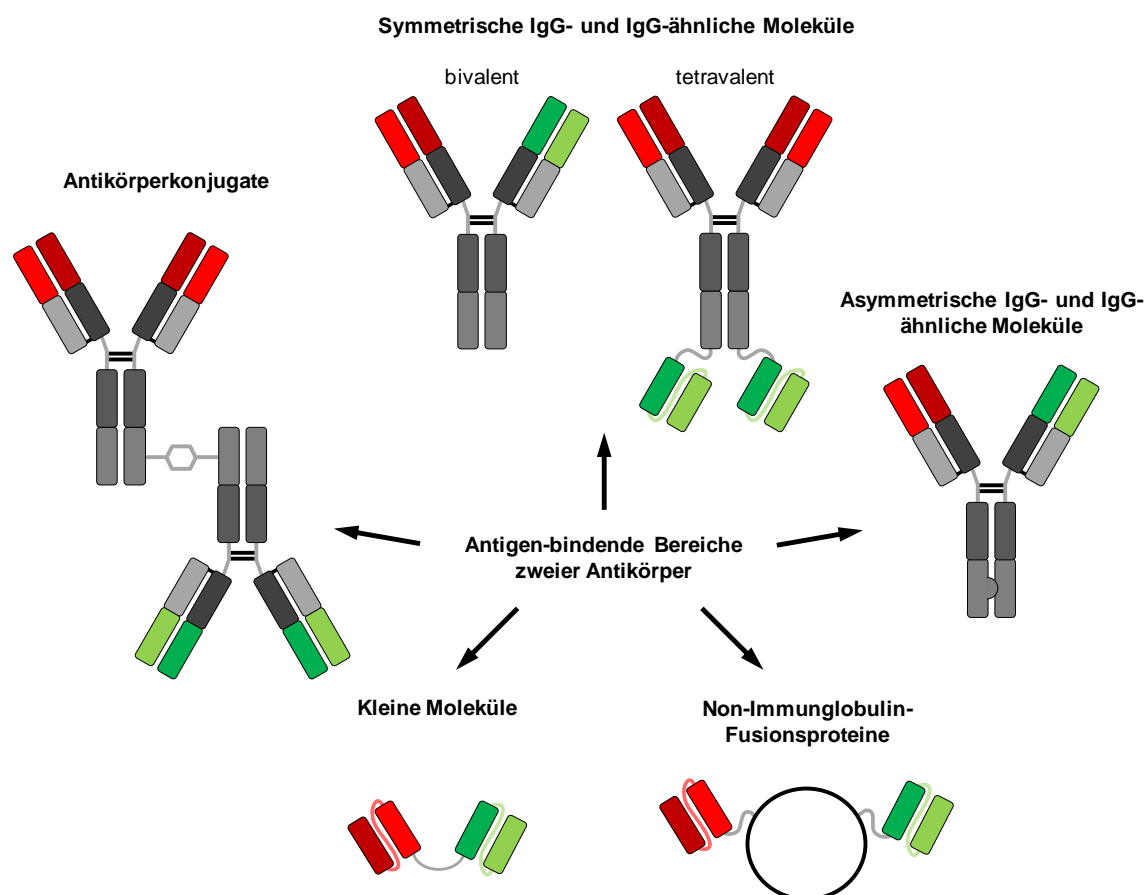
auch Quadromas genannt (Milstein & Cuello, 1983) sowie der chemischen Konjugation von Antikörpern (Staerz *et al*, 1985; Brennan *et al*, 1985). Basierend auf der Quadroma-Technologie wurde 2009 der erste bispezifische Antikörper Catumaxomab (Handelsname Removab®) in Europa für die Behandlung der malignen Aszites zugelassen. Bei Catumaxomab handelt es sich um ein Hybrid aus Maus-IgG2a und Ratten-IgG2b (Linke *et al*, 2010). Der trifunktionale Antikörper (Triomab®) bindet das Antigen CD3 auf zytotoxischen T-Zellen und das Typ 1 Transmembran-Glykoprotein EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*), welches von einer Vielzahl an epithelialen Tumoren exprimiert wird. Der Fc-Teil des Antikörpers ermöglicht eine dritte Funktion, indem er an Fc-Rezeptor-exprimierende Effektorzellen wie NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen vorzugsweise über FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) und FcγRIII (CD16) bindet und diese aktiviert (Zeidler *et al*, 1999; Fan *et al*, 2015). Die Zulassung wurde jedoch auf Antrag des Zulassungsinhabers aus finanziellen Gründen 2017 zurückgezogen (Durchführungsbeschluss der Europäischen Kommission, C(2017) 3947 final, 2017; Neovii completes marketing authorisation withdrawal of Removab® in the European Union, 2017).

Neue gentechnische Methoden ermöglichten in den letzten 20 Jahren einen erneuten raschen Fortschritt bei der Entwicklung bispezifischer Antikörper und führten zu ca. 100 verschiedenen möglichen Formaten mit vielfältigen Eigenschaften (Runcie *et al*, 2018; Brinkmann & Kontermann, 2017).

#### **3.1.3.1. Bispezifische Formate mit Fc-Teil**

Die unterschiedlichen Formate bispezifischer Antikörper können im Wesentlichen in zwei Hauptklassen unterteilt werden: Antikörper mit oder ohne Fc-Teil (siehe Abbildung 3.4). Durch den Fc-Teil können bispezifische Antikörper Effektorfunktionen wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) oder antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) vermitteln (Spiess *et al*, 2015). Durch die Bindung des Fc-Teils an den neonatalen Fc-Rezeptor FcRn wird das Recycling des Antikörpers und somit eine längere Plasma-Halbwertszeit erreicht (Kontermann, 2009). Der Fc-Teil ermöglicht darüber hinaus die Reinigung der bispezifischen Antikörper auf Basis von etablierten Protokollen für IgG-Moleküle und kann zu einer verbesserten Löslichkeit und Stabilität beitragen (Kontermann & Brinkmann, 2015).

Bispezifische Antikörper mit Fc-Teil lassen sich ferner unterteilen in Antikörper IgG-ähnlicher Struktur und Molekülen mit zusätzlichen Bindestellen (erweiterte oder modifizierte Ig-Struktur), wobei eine symmetrische oder asymmetrische Struktur vorliegen kann (siehe Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Strategien zur Generierung bispezifischer Antikörper**

Ausgehend von den Antigen-bindenden Bereichen zweier Antikörper können verschiedene Formate bispezifischer Antikörper generiert werden, welche in Antikörper mit und ohne Fc-Teil unterschieden werden können: Symmetrische IgG- oder IgG-ähnliche bispezifische Antikörper können z.B. durch Heterodimerisierung zweier unveränderter Fc-Bereiche entstehen. Möglich ist auch die Homodimerisierung zweier Fc-Teile, welche um einen Antigen-bindenden Bereich/Domäne erweitert wurden. Durch Modifikation der Fc-Teile (z.B. durch die "Knob-into-Hole"-Technologie) kann die Heterodimerisierung forciert werden, wodurch asymmetrische IgG- oder IgG-ähnliche bispezifische Antikörper entstehen.

Zur Generierung bispezifischer Antikörper ohne Fc-Teil können Antikörperfragmente, wie z.B. scFv-Fragmente an ein Non-Immunglobulin-Protein fusioniert werden. Die direkte Fusion von Antikörperfragmenten resultiert in kleinen bispezifischen Antikörpern. Eine weitere Möglichkeit bispezifische Antikörper zu generieren, ist die chemische Konjugation. (Abbildung modifiziert nach Kontermann & Brinkmann, 2015)

Bispezifische symmetrische IgG-Moleküle können durch parallele Produktion zweier verschiedener schwerer und leichter Ketten in einer Zelle hergestellt werden. Durch die zufällige Zusammenlagerung verschiedener Ketten können neben den gewünschten Heterodimeren aber auch monomere und nicht-funktionale Antikörper entstehen. Dieses Problem kann z.B. durch Fusion der zweiten Antigen-bindenden Komponente in Form eines scFv-Fragments oder eines Einzeldomänenantikörpers an den N- oder C-Terminus der leichten oder schweren Kette des Antikörpers gelöst werden. (Kontermann & Brinkmann, 2015) Zu dieser Gruppe bispezifischer Antikörper gehören z.B. *Dual-Variable-Domain-Immunglobuline* (DVD-Ig) bei denen die variablen Domänen zweier Antikörper als Tandem fusioniert werden (Wu *et al*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit Fehlpaarungen der schweren Kette zu verhindern, bietet die "*Knob-into-Hole*"-Technologie. Hierbei wird die Heterodimerisierung forciert, indem in der CH3-Domäne einer schweren Kette eine kleine Aminosäure gegen eine größere ausgetauscht wird ("*Knob*") und bei der anderen schweren Kette entsprechend eine kleine Aminosäure eingefügt wird ("*Hole*"; Ridgway *et al*, 1996). Durch diese Technik können asymmetrische IgG oder IgG-ähnliche Antikörper hergestellt werden (Kontermann & Brinkmann, 2015). Trotz des Einsatzes der "*Knob-into-Hole*"-Technologie kann es immer noch zu Fehlpaarungen der leichten Antikörperketten mit den schweren Ketten kommen. Merchant und Kollegen konnten durch Verwendung einer gemeinsamen leichten Kette für beide Arme eines bispezifischen IgG-Moleküls die Fehlpaarung der leichten Ketten erfolgreich verhindern (Merchant *et al*, 1998). Eine weitere Möglichkeit bietet die parallele Expression von Halb-Antikörpern mit "*Knob*" oder "*Hole*" in verschiedenen Bakterienstämmen (Spiess *et al*, 2013). Bei der CrossMab-Technologie wird die korrekte Paarung der leichten Ketten durch Austausch der CH1-Domäne der schweren Kette mit der konstante Domäne der leichten Kette (CL) erreicht (Schaefer *et al*, 2011). Das Einfügen von Mutationen im *Interface* von VH und VL (variable Domänen der schweren und leichten Ketten) sowie von CH1 und CL verstärkt ebenfalls die korrekte Paarung der leichten Ketten (Lewis *et al*, 2014).

#### **3.1.3.2. Bispezifische Formate ohne Fc-Teil**

Bispezifische Antikörper ohne Fc-Teil können keine Fc-vermittelten Effektorfunktionen auslösen. Ihre therapeutische Aktivität basiert daher auf ihrer Kapazität, Antigene zu binden (siehe Abbildung 3.4). Der fehlenden Fc-Teil und die meist geringere Größe bedeuten zudem



eine kürzere Plasma-Halbwertszeit. Die geringere Größe ermöglicht aber im Gegenzug eine bessere Durchdringung des Tumorgewebes. (Kontermann & Brinkmann, 2015) Als Basis werden häufig scFv-Fragmente verwendet, da diese als Derivate von VL und VH nur aus den minimalen Antigen-bindenden Bereichen eines Antikörpers bestehen. Durch Einsatz von Linkern können aus scFv-Fragmenten bispezifische Antikörper gebildet werden. (Brinkmann & Kontermann, 2017) So nutzt z.B. die BiTE<sup>®</sup>-Technologie (*Bispecific T-cell engager*) scFv-Fragmente, die über einen flexiblen Linker als Tandem verbunden wurden, zum Re-Targeting von T-Zellen zu Tumorzellen (Huehls *et al*, 2015). Mit Blinatumomab (Handelsname Blincyto<sup>®</sup>) - einem BiTE-Antikörper - wurde 2014 der erste bispezifische Antikörper von der FDA für die Therapie der B-Zell ALL (akute lymphatische Leukämie) zugelassen (Newman & Benani, 2016). Blinatumomab besteht aus einem scFv-Fragment, welches spezifisch für das Tumor-assoziierte Antigen CD19 auf B-Zellen (inkl. B-Zell-Leukämien und Lymphomen) ist, sowie einem CD3-spezifischen scFv-Fragment, das an die CD3 Epsilon-Untereinheit auf reifen T-Zellen bindet (Nagorsen *et al*, 2012; Newman & Benani, 2016). Beide Antikörperfragmente sind über einen Glycin-Serin-Linker miteinander verbunden (Brinkmann & Kontermann, 2017). Aufgrund der geringen Größe von nur 55 kDa und des fehlenden Fc-Teils besitzt Blinatumomab nur eine geringe Plasma-Halbwertszeit von weniger als zwei Stunden (Fan *et al*, 2015). Dies bedingt eine kontinuierliche mehrwöchige Infusion des Therapeutikums (Mullard, 2014; Topp *et al*, 2015).

Ein alternatives Format, welches ebenfalls nur auf den Antigen-bindenden Domänen VL und VH zweier Antikörper basiert, ist das *Diabody*-Format. Hierbei wird jeweils die VH-Domäne des einen Antikörpers über einen kurzen Peptidlinker mit der VL-Domäne des anderen fusioniert. Durch diesen Aufbau wird die Heterodimerisierung der beiden Ketten forciert (Holliger *et al*, 1993). Um die korrekte Zusammenlagerung der Ketten und die Stabilität zu verbessern, kann ein weiterer Linker zwischen beiden Ketten eingefügt werden, wodurch sogenannte *single-chain Diabodies* entstehen (Müller-Brüsselbach *et al*, 1999). Die Verbindung zweier *single-chain Diabodies* über einen weiteren Linker ermöglicht die Generierung tetravalenter Tandem-*Diabodies* (TandAbs; Kipriyanov *et al*, 1999). Einen anderen Ansatz zur Stabilisierung von *Diabodies* verfolgt die *Dual-affinity re-targeting* (DART)-Technologie, bei der zwischen beiden *Diabody*-Ketten Disulfidbrücken eingefügt werden (Johnson *et al*, 2010).

Bispezifische Antikörper können ebenso durch Fusion noch kleinerer Antigen-bindender Fragmente wie z.B. Einzeldomänen-Antikörpern aus VH oder VL sowie *Nanobodies* generiert werden. Bei *Nanobodies* handelt es sich um die Antigen-bindende Domänen aus schwere-Ketten Antikörpern, welche natürlich bei Kameliden sowie Teppichhaien und Ammenhaien vorkommen (Revets *et al*, 2005; Bannas *et al*, 2017).

Wie bei den BiTE-Molekülen führt auch die geringe Größe aller anderen Formate und das Fehlen eines Fc-Teils zu einer schnellen renalen Clearance und macht somit in der therapeutischen Anwendung die wiederholte Verabreichung notwendig (Kontermann & Brinkmann, 2015). Um die Halbwertszeit bispezifischer Antikörper zu erhöhen, können diese z.B. PEGyliert werden oder mit Albumin oder Albumin-bindenden funktionalen Gruppen fusioniert werden (Kontermann, 2011). Bei DART-Molekülen konnte die Halbwertszeit durch Fusion mit einem Fc-Teil erhöht werden, indem der Fc-Teil die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor FcRn ermöglicht (Garber, 2014). Eine weitere Strategie ist die Generierung multivalenter Antikörper wie z.B. die bereits erwähnten TandAbs. Bei der *Dock-and-Lock* (DNL)-Methode werden Antikörperfragmente oder IgG-Moleküle an die heterodimerisierenden Proteine cAMP-abhängige Proteinkinase A und das A-Kinase-Ankerprotein fusioniert, wodurch multivalente Fusionsproteine entstehen (Rossi *et al*, 2006; Rossi *et al*, 2012).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit bispezifischer Antikörper ist die Nutzung als Vehikel für Medikamente, radioaktive Isotope und Nanopartikel (Fan *et al*, 2015). Goldenberg und Kollegen nutzten einen trivalenten bispezifischen Antikörper, der mit der DNL-Methode generiert wurde, um radioaktiv markierte Peptide nach dem Pretargeting mit dem bispezifischen Antikörper zielgerichtet im Tumorbereich anzureichern (Goldenberg *et al*, 2007).

Derzeit gibt es nur zwei im Markt erhältliche bispezifische Antikörper, von denen nur der BiTE-Antikörper Blinatumomab für die Krebstherapie zugelassen ist. Der zweite bispezifische Antikörper Emicizumab (Handelsname Hemlibra<sup>®</sup>) fungiert als Mimetikum für den Gerinnungsfaktor VIII (Sampei *et al*, 2013) und wurde 2017 von der FDA für die Behandlung bei Hämophilie A zugelassen (Mullard, 2018). Die Einsatzmöglichkeiten für bispezifische Antikörper beinhalten ein weites Spektrum, angefangen bei der Diagnostik und Bildgebung über die Prophylaxe bis hin zur Therapie (Brinkmann & Kontermann, 2017).

Aufgrund der möglichen Vorteile gegenüber Einzeltherapien mit monoklonalen Antikörpern, Kombinationstherapien und der Therapie mit Antikörpergemischen ist das Interesse an der Entwicklung und Zulassung bispezifischer Antikörper sehr hoch. Daher hat die FDA zur Unterstützung der Entwickler bispezifischer Antikörper im April 2019 einen Entwurf einer Richtlinie für die Entwicklung und Zulassung bispezifischer Antikörper veröffentlicht. (Bispecific Antibodies: FDA Drafts Guidance for Developers, 2019)

Derzeit befinden sich bereits über 200 bispezifische Antikörper in klinischen Studien (Global Bispecific Antibody Market, Drug Sales & Clinical Pipeline Insight 2025, 2019).

## 3.2 Das Tumor-assoziierte Antigen CEA

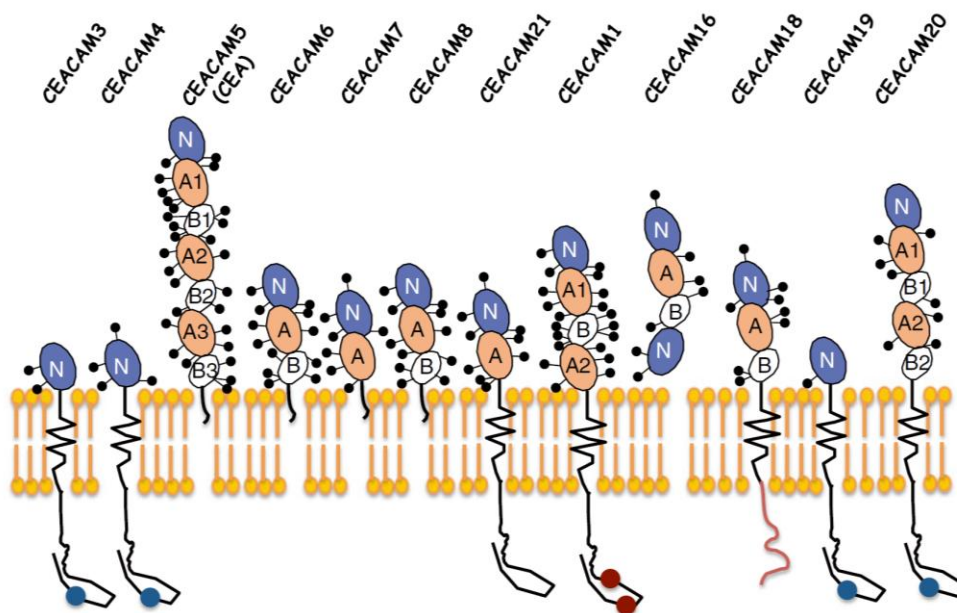
Das Karzinoembryonale Antigen (*Carcinoembryonic antigen*; CEA; auch CEACAM5) wurde erstmals 1965 von Gold und Freedman beschrieben. Zunächst wurde angenommen, dass es sich um ein onkofötales Antigen handelt, da es nur im Gewebe fötaler Verdauungsorgane und Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen wurde. Dies führte zur Bezeichnung Karzinoembryonales Antigen. (Gold & Freedman, 1965) Spätere Studien zeigten aber, dass CEA in geringen Mengen auch auf normalem Gewebe zu finden ist (Hammarström, 1999) und es sich daher um ein Tumor-assoziiertes Antigen handelt. Tumor-assoziierte Antigene zeichnen sich im Allgemeinen dadurch aus, dass sie verstärkt von Tumorzellen exprimiert werden, aber auch in geringen Mengen auf normalen Zellen zu finden sind (Morris *et al*, 2003).

### 3.2.1 Die CEACAM-Familie

CEA gehört zur Familie der Karzinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmoleküle (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*; CEACAMs), welche aus 22 separaten Genen besteht. Diese unterteilen sich in 12 CEACAM-Gene und 10 Gene, welche zur Untergruppe der Schwangerschafts-spezifischen Glykoproteine (*Pregnancy-specific glycoproteins*; PSG) gehören. Die Gene der CEACAM-Familie sind auf Chromosom 19 in den Regionen q13.1-13.2 geclustert. (Beauchemin & Arabzadeh, 2013)

Alle CEACAM-Proteine gehören zur Immunglobulin-Supergenfamilie (Beauchemin & Arabzadeh, 2013). Die Mitglieder dieser Supergenfamilie sind aus Immunglobulin- oder Immunglobulin-ähnlichen homologen Domänen aufgebaut und zeigen strukturelle Ähnlichkeiten (Hood *et al*, 1985; Williams & Barclay, 1988). Die 12 Mitglieder der CEACAM-Untergruppe bestehen jeweils aus einer bis maximal zwei Domänen, welche homolog zur variablen Immunglobulin-Domäne sind (N-Domäne), gefolgt von null bis sechs Domänen, welche homolog zum C2-Set konstanter Immunglobulin-Domänen sind (mit A oder B bezeichnet; siehe Abbildung 3.5; Hammarström, 1999; Williams, 1987; Beauchemin *et al*, 1999).

CEACAM-Proteine sind entweder über einen Glykosylphosphatidyl-Anker (GPI-Anker) oder durch Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert (Öbrink, 1997) und fungieren als homophile oder heterophile interzelluläre Adhäsionsmoleküle (Oikawa *et al*, 1992; Öbrink, 1997) oder Pathogen-Rezeptoren (Kuespert *et al*, 2006; Voges *et al*, 2012). Eine Ausnahme bildet CEACAM16 welches nicht in der Zellmembran verankert ist, sondern sekretiert wird und Oligomere bildet (Kammerer *et al*, 2012).



**Abbildung 3.5 Die CEACAM-Familie**

Die Abbildung zeigt die 12 Mitglieder der CEACAM-Untergruppe. Die CEACAM-Proteine bestehen aus ein bis zwei N-Domänen (blau), welche homolog zur variablen Immunglobulin-Domäne sind und einer unterschiedlichen Anzahl an A- (orange) und B-Domänen (weiß), die homolog zum C2-Set konstanter Immunglobulin-Domänen sind. Mit Ausnahme von CEACAM 16, bei dem es sich um ein sekretiertes Protein handelt, sind alle CEACAM-Proteine über GPI-Anker (CEA, CEACAM 6, 7 und 8) oder Transmembrandomänen (CEACAM 1, 3, 4, 19, 20, 21) in der Zellmembran verankert. CEACAM1 besitzt darüber hinaus eine zytosomatische Domäne mit inhibitorischen ITIM-Motiven (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*; rote Kreise), während CEACAM 3, 4, 19 und 20 aktivierende ITAM-Motive (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; blaue Kreise) in der zytosomatischen Domäne tragen. Alle Mitglieder der CEACAM-Untergruppe sind stark glykosyliert, was durch die schwarzen *Sticks and Balls* dargestellt ist. (Beauchemin & Arabzadeh, 2013)

CEA ist ein hoch-glykosyliertes Makromolekül, welches zu 50 - 60 % aus Kohlenhydraten besteht und eine molekulare Masse von 180-200 kDa besitzt (Hammarström, 1999; Thomas *et al*, 1990). Es ist aus einer N-Domäne sowie drei sich wiederholenden Einheiten aus A und B-Domänen aufgebaut (C2-ähnliche Immunglobulin-Domänen; Thompson *et al*, 1987; Beauchemin & Arabzadeh, 2013) und über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert (Hefta *et al*, 1988).

#### 3.2.2 Expressionsmuster und physiologische Funktion

Die Expression von CEA ist im Vergleich zu anderen CEACAM-Familienmitgliedern relativ begrenzt. CEA ist bereits in fötalem Gewebe nachweisbar und seine Expression bleibt lebenslang erhalten. Im normalen adulten Gewebe ist CEA in Dickdarm, Magen, Speiseröhre, Zunge, Gebärmutterhals, Schweißdrüsen und Prostata nachweisbar, wobei es hauptsächlich auf der apikalen Seite von Zylinderepithelzellen und Becherzellen des Kolons zu finden ist. (Hammarström, 1999; Nap *et al*, 1988; Nap *et al*, 1992) CEA ist Bestandteil der Glykokalyx/Mikrovillus-Region des Darmepithels und an der Spitze der Mikrovilli lokalisiert. Durch das Abschnüren von Mikrovesikeln aus der Mikrovillus-Membran, wird CEA in das Darmlumen abgegeben und mit der Fäzes ausgeschieden. (Hammarström, 1999) Im Blut normaler gesunder Individuen ist CEA nur in sehr geringen Konzentrationen von weniger als 2,5 ng/ml bei Nichtrauchern und weniger als 5 ng/ml bei Rauchern nachweisbar (Faria *et al*, 2019).

Obwohl CEA zur Familie der Karzinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmoleküle gehört und *in vitro* Daten eine Rolle in der Zelladhäsion implizieren (Überblick in Thompson *et al*, 1991; Hammarström, 1999), macht die vorwiegende Expression auf der apikalen Seite des Darmepithels im normalen Zustand diese Funktion eher unwahrscheinlich (Hammarström, 1999; Duffy, 2001). Thompson und Kollegen vermuten aber, dass homo- und heterophile CEA-Interaktionen eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielen könnten (Thompson *et al*, 1991).

Verschiedene Studien lassen den Schluss zu, dass CEA auf normalem Darmgewebe als eine Art "mikrobieller Rezeptor" fungiert. Leusch und Kollegen konnten zeigen, dass verschiedene *Escherichia coli* und *Salmonella* Stämme an CEA-Mannosereste binden (Leusch *et al*, 1990). Außerdem konnte die Interaktion von CEA und Virulenz-assoziierten Proteinen der äußeren Membran von *Neisseria gonorrhoeae* (*Opacity proteins*, Opa) nachgewiesen werden (Chen *et al*, 1997). Das Vorhandensein von CEA in der Glykokalyx der Darmschleimhaut und die Fähigkeit Mikroorganismen zu binden, könnte somit zur bakteriellen Kolonialisierung des Darms beitragen (Thompson *et al*, 1991) oder lässt auf eine Funktion in der angeborenen Immunantwort schließen, indem Mikroorganismen von CEA gebunden und abgefangen werden (Hammarström, 1999).

### 3.2.3 Expression und Funktion im malignen Gewebe

Bei Darmkrebs verlieren die Epithelzellen ihre Basallamina, wodurch sie in das umliegende Gewebe einwachsen. Darüber hinaus wird CEA durch den Verlust der Polarität der malignen Zelle auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert und vermutlich nach Abspaltung durch Phospholipasen (Khan & Hammarström, 1991) verstärkt in das Blut abgegeben. CEA wird darüber hinaus in Karzinomen der Lunge, Pankreas, Gallenblase, und Blase sowie muzinösen Ovarialkarzinomen und endometrischen Adenokarzinomen exprimiert. (Hammarström, 1999) Zudem wird es bei kolorektalen und Magenkarzinomen signifikant überexprimiert (Jothy *et al*, 1993; Kodera *et al*, 1993). Auf der Oberfläche von Tumorzellen fungiert CEA wahrscheinlich als interzelluläres Adhäsionsmolekül. Stanners und Kollegen konnten die interzelluläre Lokalisation von CEA sowohl im embryonalen mehrschichtigen Darmgewebe als auch in Kolontumoren nachweisen, was die Rolle als interzelluläres Adhäsionsmolekül unterstreicht (Benchimol *et al*, 1989). Die posttranslationale Modifikation der Glykosylierung von CEA während der Tumorentstehung beeinflusst dabei die Stärke der Adhäsion (Charbonneau & Stanners, 1999).

Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül zwischen Tumorzellen sowie Tumor- und Stromazellen spielt die homophile Interaktion von CEA eine Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Inhibierung von zellulären Differenzierungsprogrammen (Ilantzis *et al*, 2002; Screatton *et al*, 2000) oder der Blockierung der Anoikis (einer Form der Apoptose von Zellen durch den Verlust des Matrixkontakts) durch Inhibierung von Caspasen und Aktivierung des PI3-K/Akt Überlebens-Signalwegs (Camacho-Leal & Stanners, 2008). Durch heterophile Interaktion mit DR5 (*Death receptor 5* oder TRAIL-R2) auf der Oberfläche von kolorektalen Tumorzellen führt CEA ebenfalls zur Inhibierung der Anoikis und damit zu einer Verstärkung der Metastasierung (Samara *et al*, 2007). Die heterophile Interaktion von CEA mit dem TGF- $\beta$  Rezeptor 1 (*Transforming growth factor- $\beta$  receptor 1*, TGF- $\beta$ R1) ermöglicht die Resistenz kolorektaler Tumorzellen gegen TGF- $\beta$  vermittelte Wachstumsinhibierung (Li *et al*, 2010). *In vitro*-Studien zeigten außerdem, dass lösliches CEA, welches von kolorektalen Tumorzellen abgegeben wurde, an hepatische Kupffer-Zellen bindet und zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Dies verbessert wiederum das Überleben von metastasierenden Zellen und verstärkt die Metastasierung von kolorektalem Krebs. (Jessup *et al*, 2004; Gangopadhyay *et al*, 1996)

Zusätzlich zur Funktion als Adhäsionsmolekül und Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse ermöglicht CEA die Interaktion der Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems. Tumor-assoziiertes CEA weist im Vergleich zu normalem CEA ein verändertes Glykosylierungsmuster auf, wodurch die Tumorzellen von Patienten mit Kolonkarzinom an intratumorale unreife Dendritische Zellen binden können (Gisbergen *et al*, 2005). Dies supprimiert vermutlich die Funktion der Dendritischen Zellen und induziert Toleranz gegenüber kolorektalen Tumorzellen (Beauchemin & Arabzadeh, 2013). Die heterophile Interaktion von CEA mit dem zur CEACAM-Familie gehörenden CEACAM1 auf NK-Zellen inhibiert MHC-unabhängig das Killing der Tumorzellen durch NK-Zellen (Stern *et al*, 2005). Die Vielzahl an Interaktionen und Funktionen von Tumor-assoziiertem CEA macht es zu einem wichtigen Akteur in der Tumorentwicklung und Metastasierung und somit zu einem attraktiven Ziel für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Bisher wurde noch kein CEA-spezifischer monoklonaler Antikörper für die Therapie zugelassen, verschiedene befinden sich aber in der Entwicklung. In klinischen Studien der Phase I und II zur Therapie von kolorektalem Karzinom befindet sich z.B. der humanisierte IgG1-Antikörper Labetuzumab (hMN-14; CEACIDE<sup>TM</sup>; Sharkey *et al*, 1995; Poiron *et al*, 2010) und ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC; *Antibody drug conjugate*) aus Labetuzumab und dem Topoisomerase I Inhibitor SN-38 (Labetuzumab Govitecan; Dotan *et al*, 2017). Das Immunzytokin Cergutuzumab amunaleukin (RG7813) aus einem humanisierten IgG1 Antikörper und humanem Interleukin 2 wird ebenfalls in Phase I Studien zur Therapie von soliden Tumoren getestet (Klein *et al*, 2017; van Brummelen *et al*, 2017). Auch bispezifische Antikörper gegen CEA befinden sich bereits in klinischen Phase 1 Studien. Zu nennen sind hier der bispezifische trivalente Antikörper Cibisatamab (CEA TCB), ein humanisierter IgG1-basierter Antikörper, der bivalent an CEA und monovalent an CD3 auf T-Zellen bindet (Bacac *et al*, 2016), sowie der BiTE-Antikörper MEDI-565 (auch AMG-211), welcher ebenfalls CEA und CD3 bindet (De Vries *et al*, 2015).

#### **3.2.4 Bedeutung als Tumormarker**

Das kolorektale Karzinom ist weltweit der dritthäufigste Krebs bei Männern und der zweithäufigste bei Frauen mit 1,8 Millionen neuen Fällen und über 880.000 Todesfällen im Jahr 2018 (WHO, Cancer Today 2018). Das Auftreten variiert geografisch stark, wahrscheinlich bedingt durch unterschiedliche Ernährung und Umweltbelastungen zusätzlich



zu einer genetischen Prädisposition (Macrae, 2019). Die Überlebensrate bei kolorektalem Karzinom hängt stark vom Stadium ab, in dem der Krebs diagnostiziert wurde. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate z. B. in den USA bei 90 %, wenn der Krebs in einem frühen Stadium diagnostiziert wurde, und nur bei 13 % bei spät diagnostizierten Fällen. (Siegel *et al*, 2014)

Die differenzielle Expression in gesundem und malignen Gewebe sowie die verstärkte Abgabe von CEA ins Blut von Tumorpatienten machen es seit vielen Jahren zu einem wertvollen Tumormarker für das Management, Monitoring und die Überwachung von Patienten mit kolorektalem Krebs. So empfiehlt die *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) die Verwendung von CEA als Marker für das präoperative Staging und die chirurgische Planung bei kolorektalem Karzinom (Locker *et al*, 2006), wobei bekannt ist, dass erhöhte präoperative CEA-Spiegel mit einem ungünstigen Resultat assoziiert sind, was wiederum mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert (Faria *et al*, 2019). CEA ist außerdem ein Indikator für die Rückkehr oder Metastasierung nach der operativen Entfernung (Faria *et al*, 2019). Daher wird die postoperative Kontrolle des CEA-Spiegels bei Patienten mit Karzinomen im Stadium II und III angeraten (Locker *et al*, 2006), wobei davon ausgegangen wird, dass ein schneller Anstieg des CEA-Spiegels auf hämatogene Metastasen z.B. in Leber und Lunge hinweist (Konishi, 2002). Bei metastasierendem kolorektalem Karzinom empfiehlt die ASCO das Monitoring des CEA-Spiegels, da dauerhaft ansteigende Werte auf ein Fortschreiten der Erkrankung hinweisen (Locker *et al*, 2006).

Von der Verwendung von CEA als generellen Screening-Marker wird allgemein abgeraten (Locker *et al*, 2006). Im Fall von wenig differenzierten Tumoren können nicht erhöhte CEA-Werte zu einem falsch-negativen Ergebnis führen (Faria *et al*, 2019). Des Weiteren kann der CEA-Spiegel auch durch eine Reihe nicht-maligner Erkrankungen wie z. B. Zirrhose, Gastritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Divertikulitis und Pankreatitis erhöht sein (Goldstein & Mitchell, 2005).

### 3.3 NK-Zellen und der aktivierende Rezeptor NKG2D

#### 3.3.1 NK-Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) wurden in den 1970er Jahren zunächst auf funktioneller Ebene als große granuläre Lymphozyten beschrieben, die eine natürliche Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweisen (Kiessling *et al*, 1975; Herberman *et al*, 1975; Vivier *et al*, 2008). Erst später wurde erkannt, dass es sich um eine separate Lymphozytenlinie mit zytotoxischen und Zytokin-produzierenden Eigenschaften handelt (Trinchieri, 1989). NK-Zellen entwickeln sich hauptsächlich im Knochenmark aus CD34-positiven Vorläuferzellen (Moretta *et al*, 2002). Die Entwicklung wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und Zytokine vorangetrieben und gesteuert, wobei das Zytokin Interleukin 15 (IL15) ein essentieller Faktor für die Reifung ist (Geiger & Sun, 2016; Mrozek *et al*, 1996). NK-Zellen bilden etwa 10-15 % der peripheren Blutlymphozyten und sind phänotypisch als CD56-positive und CD3-negative Zellen definiert (Robertson & Ritz, 1990). Auf Grundlage der Stärke der Expression von CD56 auf der Oberfläche der NK-Zellen, lassen sich diese in zwei Populationen aufteilen. Ca. 90 % der NK-Zellen im peripheren Blut exprimieren nur geringe Mengen an CD56 (CD56<sup>dim</sup>), während 10 % der NK-Zellen durch eine hohe CD56-Expression (CD56<sup>bright</sup>) gekennzeichnet sind. CD56<sup>dim</sup>-Zellen kennzeichnet außerdem eine starke Expression des niedrig-affinen Fcγ-Rezeptors IIIa (FcγRIIIa; CD16a) und ein höheres zytotoxisches Potential verglichen mit CD56<sup>bright</sup>-Zellen. CD56<sup>bright</sup>-Zellen exprimieren hingegen nur geringe Mengen an CD16 und sind in der Lage nach Aktivierung durch Monozyten, große Mengen an Zytokinen zu produzieren. (Lanier *et al*, 1986; Cooper *et al*, 2001; Caligiuri, 2008) Neben der Zirkulation im Blut sind NK-Zellen auch in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und Mandeln zu finden (Ferlazzo *et al*, 2004).

##### 3.3.1.1. Physiologische Funktion

NK-Zellen sind Bestandteil der angeborenen Immunantwort und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Virus-infizierten Zellen, Pathogenen oder Tumorzellen (Moretta *et al*, 2002; Moretta & Moretta, 2004). Die Funktion von NK-Zellen ist gekennzeichnet durch die Expression und das Zusammenspiel einer Vielzahl von

aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren (Lanier, 2008). Die Expression der Rezeptoren auf den einzelnen NK-Zellen ist sehr heterogen, was darauf schließen lässt, dass NK-Zellen auf eine Reihe verschiedener Stimuli reagieren und unter verschiedenen pathologischen Bedingungen an der Immunantwort teilnehmen können. (Mandal & Viswanathan, 2015)

Ein Teil der inhibitorischen Rezeptoren bindet spezifisch an MHC-Klasse I-Moleküle welche kontinuierlich von den meisten gesunden Zellen exprimiert werden (Vivier *et al*, 2008). Durch zellulären Stress wie Infektionen oder maligne Transformation kann die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen verloren gehen (Vivier *et al*, 2008) oder herunter geregelt sein, um der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (Mandal & Viswanathan, 2015). Durch die verringerte oder fehlende Expression von MHC-Klasse I-Molekülen fehlt aber gleichzeitig das inhibitorische Signal für NK-Zellen. Die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen vermittelt somit die Toleranz der NK-Zellen gegenüber körpereigenen gesunden Zellen, wohingegen das Fehlen dieser Moleküle als "*missing self*" bezeichnet wird (Ljunggren & Kärre, 1990) und die Aktivierung von NK-Zellen ermöglicht. (Moretta & Moretta, 2004; Vivier *et al*, 2008)

Die Aktivierung von NK-Zellen wird durch Bindung entsprechender Liganden an aktivierende NK-Zell-Rezeptoren (z.B. NKG2D oder NKp46) erreicht (Moretta & Moretta, 2004), wodurch Membran-zerstörendes Perforin und die Serinprotease Granzym B durch Exozytose freigesetzt werden und zur Apoptose der Zielzelle führen (Mandal & Viswanathan, 2015). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ist die Bindung des niedrig-affinen Fcγ-Rezeptors IIIa (FcγRIIIa; CD16a) an den Fc-Teil von Antikörpern auf opsonisierten Zellen (Cooper *et al*, 2001). Diese Form der Aktivierung und anschließende Zerstörung der Zielzelle durch Freisetzung zytotoxischer Proteine wird als ADCC bezeichnet. NK-Zellen sind außerdem in der Lage durch Interaktion von Todesrezeptoren mit entsprechenden Liganden die Transduktion von Apoptosesignalen in der Zielzelle zu initiieren (Chua *et al*, 2004; Childs & Carlsten, 2015). Darüber hinaus führt die Aktivierung von NK-Zellen zur Expression verschiedener Zytokine, welche die Immunantwort verstärken (Lanier, 2008; Lanier, 2015). Für viele monoklonale therapeutische Antikörper konnte bereits gezeigt werden, dass ihr therapeutischer Effekt potentiell auf NK-Zell-Effektorfunktionen beruht (Alderson & Sondel, 2011; siehe auch Absatz 3.1.1.2).

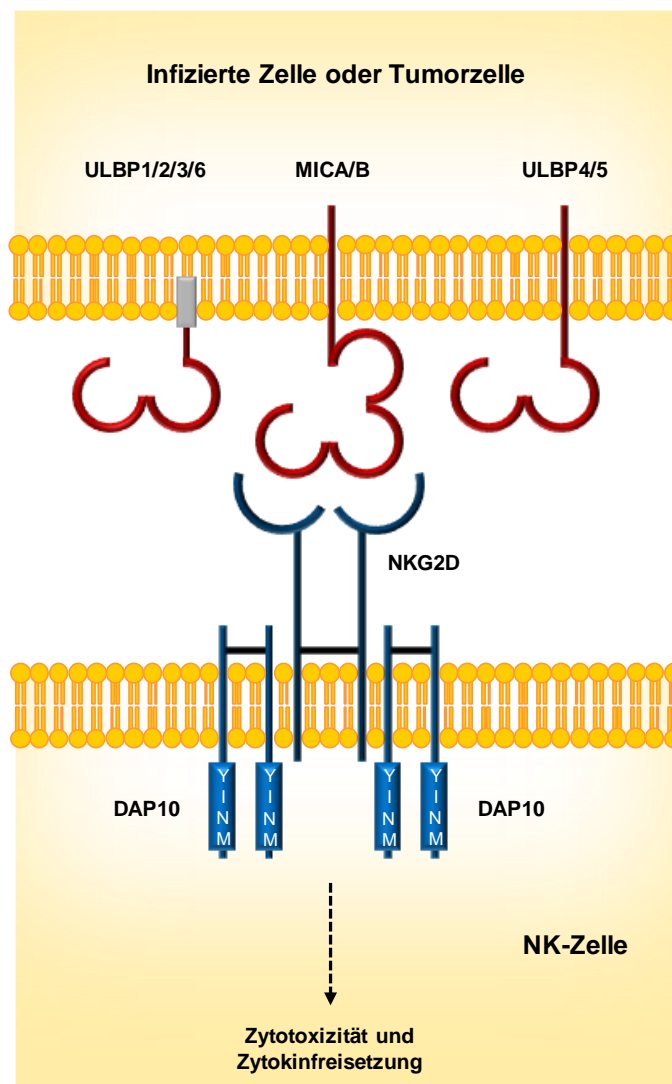
### 3.3.2 Der NKG2D-Rezeptor

Das Glykoprotein NKG2D ist ein Rezeptor, aus der Familie der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren und gehört zur Natürlichen Killer Gruppe 2 (*Natural killer group 2 member 2*, NKG2D), einer Gruppe von Typ II-Transmembranproteinen (Houchins *et al*, 1991). NKG2D wird von NK-Zellen (CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup>), den meisten zytotoxischen T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen, vielen invarianten NKT-Zellen sowie einer kleinen Gruppe von T-Helferzellen exprimiert (Bauer *et al*, 1999; Gumperz *et al*, 2002). Der Rezeptor mediiert oder costimuliert die Zytolyse von viral und bakteriell infizierten Zellen oder Tumorzellen, die bestimmte Stress-induzierte Antigene exprimieren (Gumperz *et al*, 2002; Bauer *et al*, 1999; Groh *et al*, 2001; Das *et al*, 2001).

NKG2D wird vom Gen *KLRK1* (*Killer cell lectin-like receptor K1*) codiert, welches auf Chromosom 12p13 lokalisiert ist (Glienke *et al*, 1998; Lazarova & Steinle, 2019). Das Gen *KLRK1* besitzt nur einen geringen Polymorphismus mit nur zwei Allelen, die sich auf Proteinebene in einer Aminosäure unterscheiden (Lanier, 2015).

Das NKG2D Glykoprotein besteht aus einer einzelnen extrazellulären C-Typ-Lektin-ähnlichen Domäne, einer *Stalk*-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen aminoterminalen cytoplasmatischen Ende ohne bekanntem Signalmotiv. Die extrazelluläre C-Typ-Lektin-ähnlichen Domäne vermittelt die Bindung an den Liganden, während die *Stalk*-Domäne die Bildung von NKG2D-Homodimeren durch Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht (siehe Abbildung 3.6). Die Transmembran-Domäne interagiert mit dem Signal-Adapterprotein DAP10. (Wu *et al*, 1999; Li *et al*, 2001; Lazarova & Steinle, 2019). Die Assoziation mit dem Adaptermolekül ist essentiell für die Oberflächenexpression und Signaltransduktion durch NKG2D (Lazarova & Steinle, 2019). Das DAP10-Adapterprotein (*DNAX-activating-protein 10*; Frazao *et al*, 2019) wird vom *DAP10* Gen auf Chromosom 19q13.1 codiert. Es ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer kurzen extrazellulären Domäne, welche über Disulfidbrücken Homodimere ausbildet (Wu *et al*, 1999). Die DAP10-Transmembran-Domäne interagiert über geladene Aminosäurereste mit in der Transmembran-Domäne von NKG2D (Wu *et al*, 1999; Lazarova & Steinle, 2019), wodurch hexamere Rezeptorkomplexe entstehen (Garrity *et al*, 2005). Nach Bindung eines Liganden an den NKG2D-Rezeptor kommt es über das zytoplasmatische YINM-Motiv des Adapterproteins DAP10 zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)-Signalwegs sowie weiterer

Signalwege (Lanier, 2008), welche die Zytotoxizität der NK-Zellen sowie Zytokinsekretion triggern (Upshaw *et al*, 2006; siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6 Der NKG2D-Rezeptor und seine Liganden**

NKG2D bildet zusammen mit dem Adapterprotein DAP10 einen Rezeptorkomplex (blau) aus einem NKG2D-Homodimer und zwei DAP10-Homodimeren. Die einzelnen Homodimere werden über Disulfidbrücken gebildet (schwarz). NKG2D bindet an acht MHC Klasse I-ähnliche Liganden (rot). Zwei dieser Liganden sind die MHC-Klasse I-Ketten-verwandten Proteine MICA und MICB, welche über Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert sind. Alle anderen sechs Liganden gehören zu den UL16-Bindeproteinen (ULBP1-6) und sind entweder über einen GPI-Anker (grau; ULBP1, 2, 3 und 6) oder eine Transmembrandomäne (ULBP4 und 5) in der Zellmembran verankert. Die Expression von NKG2D-Liganden wird durch zellulären Stress wie eine Infektion oder maligne Transformation induziert. Nach Bindung eines Liganden an NKG2D wird die NK-Zelle über das zytoplasmatische YIMN-Motiv im Adapterprotein DAP10 aktiviert, was zur Zytolyse der Zielzelle und Zytokinfreisetzung führt. (Abbildung modifiziert nach Vadstrup & Bendtsen, 2017)

#### 3.3.3 Die NKG2D-Liganden

Der NKG2D-Rezeptor bindet an Stress-induzierte Proteine auf der Oberfläche von Zellen (Lazarova & Steinle, 2019). Bei den NKG2D-Liganden handelt es sich um acht Proteine, welche strukturell verwandt mit MHC-Klasse I-Proteinen sind und zu zwei verschiedenen Familien gehören: MHC-Klasse I-Ketten-verwandte Proteine (MICA und MICB) und sechs UL16-Bindeproteine (ULBP1 bis 6; Frazao *et al*, 2019; siehe Abbildung 3.6). Von diesen acht Proteinen sind MICA, MICB, ULBP4 und ULBP5 transmembrane Glykoproteine wohingegen ULBP1, ULBP2, ULBP3 und ULBP6 über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert sind (Lanier, 2015). Die Expression von NKG2D-Liganden wird auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene reguliert (Raulet *et al*, 2013). Generell werden NKG2D-Liganden nicht von gesunden Zellen und Geweben von Erwachsenen exprimiert (Lanier, 2015), wobei es vereinzelte Nachweise von NKG2D-Liganden in gastrointestinalem Gewebe (Groh *et al*, 1996) und anderen Epithelien gibt (Ghadially *et al*, 2017). Die Expression der Liganden wird durch zellulären Stress wie Infektionen mit Pathogenen und maligne Transformation initiiert (Lanier, 2015) und ermöglicht die Erkennung und Zytolyse der infizierten oder transformierten Zellen durch NK-Zellen. Darüber hinaus können NK-Zellen durch die Interaktion von NKG2D mit seinen Liganden die Immunantwort modulieren (Lazarova & Steinle, 2019). So exprimieren aktivierte T-Zellen verstärkt MICA, wodurch sie von NK-Zellen lysiert werden können. Dieser Vorgang dient wahrscheinlich der Begrenzung der T-Zell-Antwort (Molinero *et al*, 2002; Cerboni *et al*, 2007). Monozyten können ebenfalls nach Aktivierung über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) die Expression von MICA initiieren, was anschließend durch Interaktion von MICA und NKG2D die Interferon  $\gamma$ -Produktion durch die NK-Zellen bewirkt (Kloss *et al*, 2008) und vermutlich eine immunstimulierende Funktion hat (Lazarova & Steinle, 2019). Verschiedene Viren haben Mechanismen entwickelt, dieser Immunantwort zu entgehen, indem sie z.B. die Expression der NKG2D-Liganden auf infizierten Zellen verhindern (Lanier, 2015) oder lösliche Proteine produzieren, die als NKG2D-Rezeptor-Antagonisten fungieren und durch hochaffine Bindung an den Rezeptor die Erkennung durch Immunzellen verhindern (Campbell *et al*, 2007).

Auch bei Tumorzellen wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, um einer NKG2D-medierten Immunantwort zu entgehen. Ein Mechanismus ist die Sekretion löslicher NKG2D-Liganden durch proteolytische Abspaltung von der Zelloberfläche durch Metalloproteasen

(Salih *et al*, 2002; Waldhauer & Steinle, 2006) oder die Thiolisomerase ERp5 (Kaiser *et al*, 2007). NKG2D-Liganden können auch mittels Exosomen von der Tumorzelle freigesetzt werden (Ashiru *et al*, 2010; Fernández-Messina *et al*, 2010). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass lösliche NKG2D-Liganden das NKG2D-Level auf der Oberfläche von Immuneffektorzellen z.B. durch Endozytose und Degradation vermindern und so die Zytotoxizität reduzieren (Groh *et al*, 2002; Ashiru *et al*, 2010). Die kontinuierliche Expression von NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen führt nach der initialen Erkennung und Zytolyse der Tumorzellen ebenfalls zur Herunterregulierung von NKG2D auf NK- und T-Zellen. Vermutlich handelt es sich um einen Feedback-Mechanismus, der die Aktivität der Effektorzellen reguliert, in diesem Fall aber das Entkommen der Tumorzellen aus der Immunantwort ermöglicht. (Lanier, 2015) Darüber hinaus können Tumorzellen durch Produktion immunmodulierender Faktoren, wie TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) die NKG2D-vermittelte Immunantwort negativ beeinflussen (Lee *et al*, 2004).

Das Expressionsmuster von NKG2D-Liganden und die Funktion des NKG2D-Signalwegs in der Zytolyse und Überwachung von Tumorzellen, machen NKG2D und seine Liganden zu interessanten Zielen für die Therapie. Die Ansätze für therapeutische Strategien sind dabei weit gefächert und reichen von der Rekrutierung von Effektorzellen durch z.B. bispezifische Antikörper, über die Beeinflussung der Immunantwort durch Zytokine, Verwendung von CAR-T oder CAR-NK-Zellen (*Chimeric antigen receptor*), bis hin zum direkten Targeting von NKG2D-Liganden oder der Verstärkung der Expression von NKG2D-Liganden. Einige Ansätze befinden sich bereits in präklinischen oder frühen klinischen Studien. (Lazarova & Steinle, 2019)

### **3.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von monoklonalen humanen Antikörpern gegen das Tumor-assoziierte Antigen CEA und das Effektorantigen NKG2D im IgG-äquivalenten scFv-Fc-Format hinsichtlich der Spezifität und Affinität zum Antigen sowie hinsichtlich des Aggregationsverhaltens. Darüber hinaus sollten bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format und IgG-scFv-Format generiert und charakterisiert werden. Der Fokus sollte bei der Charakterisierung auf die Spezifität zum Antigen und das Aggregationsverhalten gelegt werden. Die verschiedenen Formate sollten auf Grundlage eines Kassetten-basierten Vektorsystems generiert werden.

Abschließend sollte die Funktionalität der mono-und bispezifischen Antikörper in einem Zytotoxizitätsassay (ADCC-Assay) analysiert werden. Zusätzlich sollte hierbei der Einfluss eines ADCC-optimierten Fc-Teils untersucht werden.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 4.1 Verwendete Geräte und Zubehör

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	Perfect Blue	Peqlab
Blot-Apparatur	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Chromatografieranlage	ÄKTA Prime	GE Healthcare
	ÄKTA Purifier	GE Healthcare
Chromatografiesäule	Superdex 200/10/300 Increase GL	GE Healthcare
Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckman Coulter
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad
ELISA-Reader	SUNRISE	Tecan
ELISA-Washer	Columbus Plus	Tecan
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas
Heizblock	Thermomixer comfort und compact	Eppendorf
Inkubator	HeraCell (mit CO <sub>2</sub> -Begasung)	Kendro Lab Products
	Inkubationsschüttler Minitron (mit CO <sub>2</sub> -Begasung)	Infors HT
	Inkubationsschüttler Multitron	Infors HT
	Inkubator BE400	Memmert
	Thermoschüttler PST-60HL-4	Lab4you
	Thermoschüttler VorTemp 56	Labnet
Netzgeräte	EPS 301/601	Amersham Pharmacia
Mikroplatten-Reader (Fluoreszenzmessung)	Ultra	Tecan
Mikroskop	Diavert	Leitz
Mischgerät	Vortex-Genie 1	Scientific Industries
MTP-Abdeckung und Halterung	<i>Sandwich Cover</i> und <i>Cover Clamps</i>	Enzyscreen
Oberflächenplasmonresonanz (SPR) -Messgerät	Biacore 2000	GE Healthcare
PCR-Gerät	Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad
pH-Meter	CG810	Schott
Photometer	Nano Drop ND1.000	Peqlab
	Libra S11	Biochrom
Pipetten	Research	Eppendorf
	Pipetman	Gilson

Gerät	Typ	Hersteller
	Multipette Plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Acu-Jet	Brand
Proteinreinigungssystem	Profinia	Bio-Rad
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius
Rotierer und Wippen	Rotier-Heizblock Wippe GLF 3013	IKAMAG RCT Omnilab
Sterilwerkbänke	HeraSafe LaminAir HLB 2472 MSC Advantage	Heraeus Instruments Heraeus Instruments Thermo Scientific
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger
Vakuumstation	Chromabond Multi 96	Macherey-Nagel
Waagen	E 1200 S EMB 220-1 Analytic A 120 S	Sartorius Kern Sartorius
Zentrifugen	Eppendorf 5810R Eppendorf 5415D	Eppendorf Eppendorf

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Abdeckfolie für Mikrotiterplatten (AeraSeal)	Excel Scientific
Chromatografiepapier 3 mm Chr	Whatman
CM5-Chip	GE Healthcare
Combitips plus 1ml, 5 ml, 25 ml	Eppendorf
Dialyse-Kassetten Slide-A-Lyzer 3.5K	Pierce
Einwegspatel steril	VWR
Filtereinheit steril 0,45 µm, 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech
Impfeschlingen steril	Sarstedt
MabSelect SuRe Resin	GE Healthcare
Mikro-Schraubröhre 2 ml PP	Sarstedt
Parafilm	American National Can
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt
Petrischalen 10 cm, 15 cm	Greiner Bio-One, Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Sarstedt, Eppendorf, Biohit
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Greiner Bio-One
Polycarbonat Erlenmeyerkolben mit Ventildeckel	Corning
Polypropylen-24 Well 10 ml <i>Uniplate</i> U-Form	Whatman
Polypropylen-24 Well 10 ml <i>Unifilter</i> Platte 10 µm	Whatman
Polypropylen-Röhrchen 5 ml, 15 ml, 30 ml, 50 ml	Sarstedt, Corning
Polypropylen-Mikrotiterplatte 96 Well U-Form	Greiner Bio-One
Polystyrol-Abdeckplatte	Greiner Bio-One
Polystyrol-Mikrotiterplatte 96 Well Flachboden	Sarstedt

Material	Hersteller
Polystyrol-Mikrotiterplatte 96 Well Flachboden schwarz <i>medium binding</i>	Greiner Bio-One
Polystyrol-Mikrotiterplatte 96 Well V-Boden	Ritter
Polystyrol-Mikrotiterplatte 96 Well U-Boden	Greiner Bio-One
Polystyrol-EIA/RIA Platte 96 Well <i>high binding</i>	Costar
PVDF-Membran T830.1	Roth
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Säulen für die Affinitätschromatografie (Protein A)	
BioScale Mini UNOsphere SUPRA 1 ml	Bio-Rad
HiTrap MabSelect SuRe 1 ml	GE Healthcare
Säule für die Affinitätschromatografie (IMAC)	
HisTrap FF Crude 1ml	GE Healthcare
Säulen zur Entsalzung/Umpufferung	
BioScale Mini Bio-Gel P-6 <i>Desalting Cartridge</i> 10 ml	Bio-Rad
Zeba <i>Desalt Spin Column</i> 2 ml	Thermo Fisher Scientific
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml steril	Sarstedt
Spritzen Inkjet 5 ml	Braun
T-Flaschen für Zellkultur (adhärent oder Suspension) 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
TC-Platte 6/12/24 Well Polystyrol	SPL Life Sciences
Zellkulturschale 100 x 20 mm Polystyrol	SPL Life Sciences
Zellulose-Acetat-Filter 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech

### 4.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth, MBI Fermentas, Merck, New England Biolabs, Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haën) und Roche.

### 4.1.4 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders im Test vermerkt, mit Reinstwasser hergestellt oder verdünnt.

Tabelle 4.3 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Komponente	Konzentration
<b>Allgemeines</b>		
<b>Carbonatpuffer pH 9,7</b>	Natriumhydrogencarbonat	35 mM
	Natriumcarbonat	15 mM
<b>Glycerin</b>	Glycerin steril	100 %

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<b>PBS (1 x) pH 7,4</b>	Natriumchlorid	137 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	8,1 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mM
<b>PBS-T</b>	PBS	1x
	Tween 20	0,05-0,1 % (v/v)
<b>Zytotoxizitätsassay (ADCC)</b>		
<b>Calcein-AM-Stammlösung</b>	Calcein-AM (eBioscience)	1 mg/ml
	DMSO (wasserfrei)	100 %
<b>Affinitätschromatografie (IMAC, Profinia)</b>		
<b>Bindepuffer pH 7,4</b>	Dinatriumhydrogenphosphat	20 mM
	Natriumchlorid	0,5 M
	Imidazol	10 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	20 mM (zur pH-Einstellung)
<b>Waschpuffer 1</b>	Bindepuffer mit Imidazol	20 mM
<b>Waschpuffer 2</b>	Bindepuffer mit Imidazol	40 mM
<b>Elutionspuffer pH 7,4</b>	Bindepuffer mit Imidazol	500 mM
<b>Affinitätschromatografie (Protein A, Äkta Prime)</b>		
<b>Binde- und Waschpuffer pH 7,4</b>	Dinatriumhydrogenphosphat	20 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	20 mM
<b>Elutionspuffer pH 3,0</b>	Natriumcitrat	100 mM
<b>Neutralisationspuffer pH 9,0</b>	Tris-HCl	2 M
<b>Affinitätschromatografie (Protein A, Profinia)</b>		
<b>Binde-, Wasch- und Equilibrierungspuffer bzw. Entsalzungspuffer pH 7,4</b>	Natriumchlorid	137 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	4,3 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	8,1 mM
<b>Elutionspuffer pH 3,0</b>	Natriumcitrat	100 mM
<b>Affinitätschromatografie (Protein A, 24 Well Platte)</b>		
<b>Binde- und Equilibrierungspuffer bzw. Waschpuffer 1</b>	PBS	1 x
<b>Elutionspuffer pH 3,0</b>	Natriumcitrat	100 mM
<b>Neutralisierungslösung</b>	Tris	1 M
<b>Waschpuffer 2 pH 5,0</b>	Natriumcitrat	100 mM
<b>Agarosegelelektrophorese</b>		
<b>Agarosegel</b>	Agarose in 1x TAE-Puffer	1 % (w/v)
<b>Ethidiumbromidlösung</b>	Ethidiumbromid	25 mM

Lösung/Puffer	Komponente	Konzentration
<b>TAE-Laufpuffer (1 x) pH 8,0</b>	Tris-HCl	4 mM
	Essigsäure	2 mM
	EDTA	1 mM
<b>Coomassie-Färbung</b>		
<b>Entfärbelösung</b>	Essigsäure	10 % (v/v)
<b>Färbelösung</b>	Coomassie Brilliant Blue R250	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
<b>ELISA</b>		
<b>Blocklösung</b>	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBS	1 x
<b>BSA-Lösung</b>	BSA (Serva)	100 µg (w/v)
	PBS	1 x
<b>Substratlösung (TMB)</b>	TMB A	20 Teile
	TMB B	1 Teil
<b>TMB Lösung A pH 4,1</b>	Kaliumcitrat	30 mM
	Zitronensäure	52 mM
<b>TMB Lösung B</b>	Tetramethylbenzidin	1 mM
	Aceton	10 % (v/v)
	Ethanol	90 % (v/v)
	Wasserstoffperoxid	0,3 % (v/v)
<b>Stopplösung</b>	Schwefelsäure	0,5 M
<b>Fluoreszenzfärbung (Durchflusszytometrie)</b>		
<b>Färbepuffer</b>	FCS inaktiviert (PAA)	2 % (v/v)
	EDTA	2 mM
	PBS	1 x
<b>Propidiumiodid-Lösung (2 x)</b>	Propidiumiodid	3 µM
	EDTA	2 mM
	Natriumazid	1,5 mM
	PBS	1 x
<b>Propidiumiodid-Stammlösung</b>	Propidiumiodid	0,15 mM
	PBS	1 x
<b>Oberflächenplasmonresonanz (Biacore)</b>		
<b>Acetatpuffer pH 3,5/4,0/4,5</b>	Natriumacetat	10 mM (eingestellt mit 10 mM Essigsäure)
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (GE Healthcare)	75 g/l
<b>Ethanolamin pH 8,5</b>	Ethanolamin (GE Healthcare)	1 M
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid (GE Healthcare)	11,5 g/l
<b>Laufpuffer (PBS-T)</b>	PBS	1 x
	Tween 20 (peroxidfrei)	0,005 % (v/v)
<b>Phagen-Display/ Panning</b>		
<b>Blocklösung</b>	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBS-T	1 x; 0,1 %

Lösung/Puffer	Komponente	Konzentration
<b>Panning-Block</b>	Milchpulver	1 % (w/v)
	BSA	1 % (w/v)
	PBS-T	1 x; 0,1 %
<b>Trypsin-Lösung</b>	Trypsin	1 mg (w/v)
	PBS	1 x
<b>Plasmid-DNA-Fällung</b>		
<b>Isopropanol</b>	Isopropanol	100 % (v/v)
<b>70 % Ethanol</b>	Ethanol (analytisch)	70 ml (v/v)
<b>Präparation peripherer Blutlymphozyten</b>		
<b>Erythrozyten-Lysepuffer</b>	Ammoniumchlorid	15 mM
	Kaliumhydrogencarbonat	1 mM
	EDTA	0,13 mM
<b>Säugerzellkultur-Lösungen</b>		
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid Rotipuran (Carl Roth)	≥ 99,8 %
<b>PEI</b>	Polyethylenimin linear 25 kDa (Polysciences)	1 g/l
<b>Trypanblau-Färbelösung</b>	Trypanblau	0,1 % (w/v)
	PBS	1 x
<b>Trypsin/EDTA</b>	Trypsin/EDTA (PAA)	1 x
<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>		
<b>Acrylamidmix</b>	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
<b>APS-Lösung</b>	Ammoniumpersulfat	10 % (w/v)
<b>Laemmli-Puffer (5 x)</b>	β-Mercaptoethanol	15 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
<b>Ladepuffer ohne β-Mercaptoethanol (5 x)</b>	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
<b>Sammelgelpuffer</b>	Tris-HCl pH 6,8	1 M
<b>SDS-Laufpuffer pH 8,3</b>	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris-HCl	25 mM
<b>SDS-Lösung</b>	SDS	10 % (w/v)
<b>Trenngelpuffer</b>	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
<b>Western Blot und Immunfärbung (AP-konjugiert)</b>		
<b>BCIP-Lösung</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	50 mM
	Dimethylformamid	100 % (v/v)
<b>Blocklösung</b>	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBS	1 x
<b>Laufpuffer (1 x) pH 8,3</b>	Glycin	192 mM
	Tris	25 mM
<b>Methanol</b>	Methanol	100 (v/v)

Lösung/Puffer	Komponente	Konzentration
<b>NBT-Lösung</b>	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	36,7 mM
	Dimethylformamid	70 % (v/v)
<b>Substratpuffer pH 9,5</b>	Tris-HCl	100 mM
	Magnesiumchlorid	0,5 mM

## 4.1.5 Medien und Supplemente

### 4.1.5.1. Prokaryotische Kultivierung

Alle Medien und Supplemente wurde in Reinstwasser gelöst und anschließend autoklaviert. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert und den Nährmedien nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

**Tabelle 4.4 Verwendete Medien und Supplemente für die prokaryotische Kultivierung**

Medium/Lösung	Komponente	Konzentration
<b>2 x YT-Medium pH 7,0</b>	Trypton	1,6 % (w/v)
	Hefeextrakt	1 % (w/v)
	Natriumchlorid	0,5 % (w/v)
<b>2 x YT-Agar</b>	2 x YT-Medium	1 x
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
<b>2 x YT-AK-Medium</b>	2 x YT-Medium	1 x
	Ampicillin	100 mg/l
	Kanamycin	50 mg/l
<b>2 x YT-GA-Medium</b>	2 x YT-Medium	1 x
	Glucose	100 mM
	Ampicillin	100 mg/l
<b>2 x YT-T-Medium</b>	2 x YT-Medium	1 x
	Tetracyclin	20 mg/l
<b>Ampicillinstammlösung</b>	Ampicillin	100 g/l
<b>Glucosestammlösung</b>	Glucose	2 M
<b>IPTG-Stammlösung</b>	IPTG	1 M
<b>Kanamycinstammlösung</b>	Kanamycin	50 g/l
<b>LB-Medium</b>	Trypton	1 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Natriumchlorid	1 % (w/v)
<b>Magnesium<sup>2+</sup>-Lösung</b>	Magnesiumchlorid	1 M
	Magnesiumsulfat	1 M
<b>Tetracyclinstammlösung</b>	Tetracyclin	10 g/l
<b>SOC-Medium pH 7,0</b>	Trypton	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Natriumchlorid	0,005 % (w/v)
	Magnesium <sup>2+</sup> -Lösung	20 mM
	Glucose	20 mM

## 4.1.5.2. Eukaryotische Kultivierung

Tabelle 4.5 Verwendete Medien und Lösungen für die eukaryotische Kultivierung

Medium/Lösung	Komponente	Konzentration
<b>Alpha-MEM-Kulturmedium</b>	Alpha-MEM mit Ribo- und Desoxyribonucleosiden (PAA)	1 x
	FCS	12,5 %
	HS	12,5 %
	L-Glutamin	2 mM
	IL2	10 ng/ml
<b>DMEM-Kulturmedium</b>	DMEM High Glc (4,5 %) with L-Glutamine (PAA)	1 x
	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
<b>DMEM-Kulturmedium für SKOV-3</b>	DMEM High Glc (4,5 %) with L-Glutamine (PAA)	1 x
	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 %
	Nicht-essentielle Aminosäuren	1 x
<b>F17-Kulturmedium</b>	F17-Medium (Invitrogen)	1 x
	L-Glutamin	7,5 mM
	Pluronic-F68	0,1 % (w/v)
	G418	25 µg/ml
<b>F17-Transfektionsmedium</b>	F17-Medium (Invitrogen)	1 x
	L-Glutamin	7,5 mM
	Pluronic-F68	0,1 % (w/v)
<b>FCS (Fötales Kälberserum)</b>	FCS inaktiviert (PAA)	100 % (v/v)
<b>HS (Pferdeserum)</b>	HS inaktiviert (PAA)	100 % (v/v)
<b>IL2 (Interleukin 2)</b>	Proleukin S (Novartis)	10 µg/ml
		(1,64 x 10 <sup>5</sup> IE/ml)
<b>L-Glutamin-Stammlösung</b>	L-Glutamin (PAA)	200 mM
<b>Natriumpyruvat-Stammlösung</b>	Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific)	100 mM
<b>Nicht-essentielle Aminosäuren</b>	Nicht-essentielle Aminosäuren (Thermo Fisher Scientific)	100 x
<b>Penicillin/Streptomycin-Stammlösung</b>	Penicillin/Streptomycin	1 M (100 x)
<b>Pluronic-F68-Stammlösung</b>	Pluronic-F68 (AppliChem)	10 % (w/v)
<b>RPMI 1640-Kulturmedium</b>	RPMI 1640 (PAA)	1 x
	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
<b>TN1-Stammlösung</b>	TN1 Trypton (Organotechnie S.A.S.)	20 % (w/v)
	F17-Medium	1 x



### 4.1.6 Bakterienstämme, Bakteriophagen und eukaryotische Zelllinien

Tabelle 4.6 Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen

Bakterien/Bakteriophagen	Genotyp	Herkunft/Referenz
<b>E. coli XL1-Blue MRF'</b>	K12: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1}$ $\text{supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB}$ $\text{lacI}_q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}_r\text{)]}$	Stratagene
<b>Helferphage M13K07</b>	-	Vieira & Messing, 1987 GE Healthcare

Tabelle 4.7 Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
<b>HEK293-6E</b>	Humane embryonale Nierenzellen	Durocher <i>et al</i> , 2002
<b>HeLa</b>	Epitheliale Cervixkarzinomzellen	Scherer & Syverton, 1954 ATCC CCL-2
<b>LOVO</b>	Kolonadenokarzinomzellen	Drewinko <i>et al</i> , 1976 ATCC CCL-229
<b>LS-174T</b>	Kolonadenokarzinomzellen	Tom <i>et al</i> , 1976 ATCC CL-188
<b>MSTO-211H</b>	Mesotheliomzellen	Bepler <i>et al</i> , 1988 ATCC CCL-2081
<b>NK-92</b>	Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen	Gong <i>et al</i> , 1994 ATCC CRL-2407
<b>SKOV-3</b>	Ovariale Adenokarzinomzellen	Fogh, 1975 ATCC HTB-77
<b>SW403</b>	Kolorektale Adenokarzinomzellen	Leibovitz <i>et al</i> , 1976 ATCC CCL-403
<b>T-47D</b>	Epitheliale Mammakarzinomzellen	Keydar <i>et al</i> , 1979 ATCC HTB-133

### 4.1.7 Plasmide

Tabelle 4.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck
<b>pHAL14</b>	Phagemid, Phagen-Display, Expression von scFv-Fragmenten in <i>E. coli</i>
<b>pCMX2.5-hIgG1-Fc-XP</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von Antigen-Fc-Fusionen (humaner Fc-Teil)
<b>pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von scFv-Fc-Antikörpern, Antigen-Fc-Fusionen (humaner Fc-Teil) und Antigenen
<b>pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von Antigen-Fc-Fusionen (muriner Fc-Teil)
<b>pCSE2.5-HIS-XP</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von Antigenen mit HIS-Tag

Plasmid	Verwendungszweck
pCSEH1c	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion der schweren Kette von humanem IgG1 sowie bispezifischen IgG-scFv-Antikörpern
pCSL3l	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion der leichten Kette Typ Lambda von humanen IgG1-Antikörpern
pCSL3k	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion der leichten Kette Typ Kappa von humanen IgG1-Antikörpern
pCSE5.2-hIgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von bispezifischen scFv-Fc-scFv-Antikörpern (humaner Fc-Teil, Linkervariante 2)
pCSE5.3-hIgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von bispezifischen scFv-Fc-scFv-Antikörpern (humaner Fc-Teil, Linkervariante 3)
pCSE5.4-hIgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von bispezifischen scFv-Fc-scFv-Antikörpern (humaner Fc-Teil, Linkervariante 4)
pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion von scFv-Fc-Antikörpern mit humanem ADCC-optimiertem Fc-Teil
pCSEH3c	Expressionsvektor für Säugerzellen, Produktion der schweren Kette von humanem IgG1 sowie bispezifischen IgG-scFv-Antikörpern mit ADCC-optimiertem Fc-Teil
pDONR223	Gateway-Vektor für Klonierungen
pCR2.1	Klonierungsvektor
pSEC-Xencor	Klonierungsvektor
pMA-T	Klonierungsvektor für synthetisierte Gene (Invitrogen GeneART)

#### 4.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 4.9 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
CM2_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
MHBGH_r	TAGAAGGCACAGTCGAGG
MHLacZ-Pro_f	GGCTCGTATGTTGTGTGG
MHgIII_r	CTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC
NS20	CCAGGAGTTCAGGTGCTG
SUW_4D5VH_NheI_r	TGTCGCTAGCGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
SUW_4D5VK_BsiWI_r	CCACCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTACC
SUW_61-IIC11_DraIII_r	GTGACACTTGGTGCAGCCTTGGGCTGACCTAGGACGGTAACC GTGGTCC
SUW_61-IIC11_NheI_r	CGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGG
SUW_AgeI_4D5VK_f	CAGCACCGGTGATATCCAGATGACCCAGTCC
SUW_AgeI_61-IIC11_f	CAGCACCGGTCAGTCTGCCCTGACTCAGCC
SUW_BssHII_4D5VH_f	CTAGGCGCGCACTCCGAGGTTTCAGCTGGTGGAG
SUW_BssHII_61-IIC11_f	CCAGGCGCGCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
SUW_BssHII_FLAG_hDAP10_f	CACAGGCGCGCACAGCGAC
SUW_CD66e_PacI_f	CCTATTAATTAAGCCACCATGGAGTCTCCCTCGGCC
SUW-CD66e-seq	CGCAGTGATTCAGTCATCCTG
SUW_CD66e_XbaI_r	CGCCTCTAGATTTATTTATATCAGAGCAACCCCAACC

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
SUW_CEA_d3_NotI_r	TGGAGCGGCCGCTGGCTCTGCATAGACTGTG
SUW_CEA_d5_NotI_r	TGGAGCGGCCGCAGAGACTGTGATTGTCTTG
SUW_CEA_d7_NotI_r	TGGAGCGGCCGCTGAGAGACCAGGAGAAGTTC
SUW_DAP10_XbaI_r	GAGCTTCTAGATTCAGCCTCTG
SUW_MluI_VK_Tras_f	GAAGCACGCGTAGATATCCAGATGACCCAGTC
SUW_mut_XbaI_r	TGTCGCTAGCGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGACCCCAAT AGTCCATAGCATAGAAGCCGTCCCCTCCCCATCTGGAACAAT AATAGACG
SUW_NcoI_CEA_d1_f	CACTCCATGGCCAAGCTCACTATTGAATCC
SUW_NcoI_CEA_d3_f	CACTCCATGGCCGATGCCCCACCATTTCCTCC
SUW_NcoI_CEA_d5_f	CACTCCATGGCCGACGACCCACCATTTCCTCC
SUW_NcoI_VH_Tras_f	CACTCCATGGCCGAGGTTCAGCTGGTGGAGTC
SUW_NKG2D_NotI_r	GTTAGCGGCCGCCACAGTCCTTTGCATGCAG
SUW_NKG2D_PacI_f	GATCTTAATTAAGCCACCATGGGGTGGATTTCGTGGTCGGAG
SUW_NKG2D_XbaI_r	GCTGTCTAGATTTATTTACACAGTCCTTTGCATG
SUW_VH_Tras_HindIII_r	CTTCAAGCTTTGGGGCGGATGCACTCCCGGAGACGGTGACCA GGGTTC
SUW_VK_Tras_NotI_r	GCTAGCGGCCGCGGAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTT GATCTCCACCTTGGTAC
TM-Fc-seq-r	GGGAGATCATGAG
ToR-pCMV-mlgG01-Fc-seq-f	CACTTTGCCTTTCTCTCC
ToR-pCMV-mlgG01-Fc-seq-r	CAGATGGCTGGCAACTAG

#### 4.1.9 Enzyme

Tabelle 4.10 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
<b>CIP</b> ( <i>Calf intestine phosphatase</i> )	New England Biolabs
<b>GoTaq DNA-Polymerase</b>	Promega
<b>Phusion DNA-Polymerase</b>	Finnzymes
<b>Restriktionsendonucleasen</b>	New England Biolabs
<b>T4-DNA-Ligase</b>	Promega
<b>Trypsin</b>	Sigma

#### 4.1.10 Antikörper

Tabelle 4.11 Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft
<b>Maus <math>\alpha</math>-c-Myc-Tag (9E10), monoklonal</b>	AG Dübel
<b>Maus <math>\alpha</math>-FLAG Clone M2 (F3165), monoklonal</b>	Sigma
<b>Ziege <math>\alpha</math>-Maus IgG (Fab-spezifisch) HRP-konj. (A2304), polyklonal</b>	Sigma

Antikörper	Herkunft
Ziege $\alpha$ -Maus IgG (Fab-spezifisch) AP-konj. (A2179), polyklonal	Sigma
Ziege $\alpha$ -Maus IgG (Fc-spezifisch) AP-konj. (115-055-071), polyklonal	Dianova
Ziege $\alpha$ -Maus IgG (Fc-spezifisch) FITC-konj. (F5897), polyklonal	Sigma
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) (I1761), polyklonal, polyvalent	Sigma
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) AP-konj. (109-055-098), polyklonal	Dianova
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) HRP-konjugiert (A0170), polyklonal	Sigma
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc $\gamma$ -spezifisch) FITC-konj. (109-095-098), polyklonal	Dianova

#### 4.1.11 Kit-Systeme

Tabelle 4.12 Verwendete Kit-Systeme

Antikörper	Herkunft
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab

#### 4.1.12 Software und Datenbanken

Tabelle 4.13 Verwendete Software und Datenbanken

Produkt	Anwendung	Anbieter
<b>BIAevaluation 4.1</b>	Auswertung der SPR-Analysen	GE Healthcare
<b>Clustal W</b>	Sequenzvergleiche	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
<b>Finch TV 1.4.0</b>	Darstellung und Auswertung von DNA-Sequenzierdaten	Geospiza Inc.
<b>FlowJo 7</b>	Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten	Tree Star Inc.
<b>IMGT</b>	Analyse von Antikörpersequenzen	Lefranc <i>et al</i> , 2015 <a href="http://www.imgt.org/">http://www.imgt.org/</a>
<b>MultAlign</b>	Sequenzvergleiche	Corpet, 1988 <a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a>
<b>NCBI</b>	Literatur, DNA- und Proteinsequenzen, Sequenzabgleiche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<b>Office 2007</b>	Textverarbeitung, Bildbearbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft
<b>Unicorn 5.10</b>	Chromatografieauswertung	GE Healthcare
<b>UniProt</b>	Proteinsequenzen	The UniProt Consortium, 2019 <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
<b>VBASE2</b>	Analyse von Antikörpersequenzen	Retter <i>et al</i> , 2005 <a href="http://www.vbase2.org/">http://www.vbase2.org/</a>
<b>Vector NTI Suite 10</b>	Erstellen und Ansicht von Vektorkarten	Invitrogen

### 4.1.13 Sonstiges

Tabelle 4.14 Zusätzliche Materialien

Material	Herkunft
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Fermentas
6 x DNA-Ladepuffer	Fermentas
BSA 100 x	New England Biolabs
dNTPs	Fermentas
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare
<i>Gene Ruler 1kB Plus DNA Ladder</i>	Fermentas
HBSS, <i>Hank's balanced salt solution</i> (mit Calcium, Magnesium und Phenolrot)	PAA
<i>Human N Protein Standard SL</i>	Siemens
<i>Low Molecular Weight DNA Ladder</i>	New England Biolabs
<i>Precision Plus Protein Standard dual color</i>	BioRad
<i>Precision Plus Protein Standard unstained</i>	BioRad

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Kulturen unter Verwendung der Kitsysteme peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II oder NucleoBond Xtra Midi Kit nach Herstellerangaben präpariert. Die Elution erfolgte in 50-300 µl des zum Kit gehörigen Elutionspuffers.

### 4.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986). Die Zusammensetzung und Temperaturprofile verschiedener DNA-Amplifikationen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.2.2.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Für Klonierungen wurden Genabschnitte mittels PCR unter Verwendung flankierender *Primer* (Oligonukleotide) aus der Matrizen-DNA amplifiziert. Bei Bedarf wurden zusätzlich Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen über die verwendeten *Primer* in das DNA-Fragment eingefügt. Die Zusammensetzung und das Temperaturprofil einer PCR für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen sind nachfolgend dargestellt.

**Tabelle 4.15** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Komponente	Volumen [µl]
Matrizen-DNA (1 ng)	1,0
<i>Primer forward</i> 10 µM	0,5
<i>Primer reverse</i> 10 µM	0,5
dNTPs je 10 mM	1,0
HF-Reaktionspuffer (5 x)	10,0
Phusion Polymerase 2 U/µl	0,5
dH <sub>2</sub> O	36,5
gesamt	50,0

Tabelle 4.16 Temperaturprofil einer PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Temperatur [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
98	1:00	1 x
98	0:15	} 29 x
50-66	0:20 - 0:30	
72	0:20 - 1:30	
72	5:00	1 x
16	∞	

#### 4.2.2.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Variante der PCR, bei der anstelle gereinigter DNA eine Bakterienkolonie für die DNA-Amplifikation verwendet wird. Das Verfahren dient zum schnellen Screening von Einzelkolonien nach Klonierungen. Die Zusammensetzung und das Temperaturprofil einer Kolonie-PCR sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 4.17 Zusammensetzung einer Kolonie-PCR

Komponente	Volumen [μl]
Matrizen-DNA (Kolonie)	-
<i>Primer forward</i> 10 μM	0,5
<i>Primer reverse</i> 10 μM	0,5
dNTPs je 10 mM	0,2
GoTaq®-Reaktionspuffer ohne Magnesiumchlorid (5 x)	2,0
Magnesiumchlorid (25 mM)	0,8
GoTaq®-Polymerase 5 U/μl	0,05
dH <sub>2</sub> O	5,95
gesamt	10,0

Tabelle 4.18 Temperaturprofil einer Kolonie-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
95	2:00	1 x
94	0:15	} 24 x
52-58	0:20	
72	0:30 - 3:00	
72	5:00	1 x
16	∞	

### 4.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand der Größe wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden Agarosegele aus 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer hergestellt und mit 3-50 µl DNA-Probe beladen. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein DNA-Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte anschließend für 20 - 50 min bei 100 - 150 V und 75 - 250 mA. Durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid bei der Herstellung des Agarosegels, konnte die DNA im Anschluss an die Elektrophorese unter UV-Licht nachgewiesen werden.

### 4.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR, aus Agarosegelen oder nach enzymatischer Restriktion erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA-Fragmente wurden in 20 - 50 µl zum Kit gehörenden Elutionspuffer eluiert.

### 4.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption ( $A_{260\text{ nm}}$ ) von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA.

### 4.2.6 Enzymatische Restriktion von DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden diese mit Typ II-Restriktionsendonucleasen geschnitten. Die Verwendung dieser Enzyme erlaubt die sequenzspezifische Restriktion und Herstellung von DNA-Fragmenten definierter Größe. Die Restriktionen wurden typischerweise in 50 µl Ansätzen mit 1 - 6 µg DNA für 1 - 2 Stunden durchgeführt. Die Wahl des Reaktionspuffers und der Inkubationstemperatur erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss erfolgte ggf. die Dephosphorylierung sowie die Hitzeinaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65 °C oder 80 °C. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes ist beispielhaft in Tabelle 4.19 aufgeführt.



Tabelle 4.19 Zusammensetzung eines Ansatzes für die enzymatische Restriktion

Komponente	Volumen [µl]
DNA (1 -6 µg)	x
Restriktionsenzym (z.B. NcoI-HF) 20 U/µl	1,0
Restriktionsenzym (z.B. NotI-HF) 20 U/µl	1,0
Reaktionspuffer (10 x)	5,0
BSA (100 x)	0,5
dH <sub>2</sub> O	42,5 - x
gesamt	50,0

#### 4.2.7 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religationsrate geschnittener Vektor-DNA zu verringern, wurde diese im Anschluss an die Restriktion dephosphoryliert. Dabei wird die endständige 5'-Phosphatgruppe enzymatisch von linearen DNA-Fragmenten abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde mit dem Enzym CIP (*Calf intestine phosphatase*) durchgeführt. Vor der Hitzeinaktivierung der Restriktionsansätze wurden 0,5 µl CIP zum Ansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, der Ansatz anschließend inaktiviert und die DNA-Fragmente für die weitere Verwendung gereinigt.

#### 4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation geschnittener DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase über Nacht (16 h) bei 16 °C durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ligationsansätze wurde so gewählt, dass das molare Verhältnis von Vektor zu Insert bei 1:3 lag. Die entsprechenden DNA-Mengen wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} * \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} * \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]}$$

Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist beispielhaft in Tabelle 4.20 dargestellt.

**Tabelle 4.20 Zusammensetzung eines Ligationsansatzes**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Menge
Vektor-DNA	x	50 ng
Insert-DNA (z.B. 800 bp)	y	24 ng
Reaktionspuffer (10 x)	2,0	
T4 DNA-Ligase 3 U/ $\mu$ l	0,33	
dH <sub>2</sub> O	17,67 - x - y	
gesamt	20,0	

### 4.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG. Die Proben und *Primer* wurden hierfür in der benötigten Konzentration und dem vorgegebenen Volumen vorbereitet und an den Anbieter geschickt. Die Sequenzen wurden nach Erhalt mit Hilfe der Programme FinchTV, MultAlign und VBASE2 ausgewertet.

## 4.3 Mikrobiologische Methoden

### 4.3.1 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-Blue MRF') wurden langsam auf Eis aufgetaut und 50  $\mu$ l Zellsuspension vorsichtig mit 10  $\mu$ l Ligationsansatz gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und das Abkühlen für 2 min auf Eis. Anschließend wurden 500  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C und 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Zur Reduktion des Volumens des Ansatzes wurde dieser für 5 min bei 400 xg zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100  $\mu$ l abgenommen und das Zellpellet vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf 2 x YT-Agar mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht (16 h) bei 37 °C inkubiert.

### 4.3.2 Anlage von Glycerinstocks

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden Gefrierkulturen (Glycerinstocks) angelegt. Hierzu wurden Flüssigkulturen nach über Nacht-Inkubation zu 20 % (v/v) mit Glycerin (100 %) versetzt und in Microschraubröhren bei - 80 °C aufbewahrt.

### 4.3.3 Selektion von Antikörpern mittels Phagen-Display und *Panning*

Für die Selektion von scFv-Antikörperfragmenten aus den Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 (Hust *et al*, 2011) wurde zunächst das Antigen (als Antigen-Fc-Fusionsprotein) in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Costar) immobilisiert. Hierzu wurden pro Vertiefung 5 µg Antigen in 1 x PBS in einem Gesamtvolumen von 150 µl über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Ausschlagen der Antigenlösung aus der Vertiefung wurde diese mit 300 µl Blocklösung gefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Die Blocklösung wurde anschließend aus der Kavität entfernt und jeweils  $5 \times 10^{11}$  cfu (*Colony forming units*) Antikörper-tragender Phagen aus den Bibliotheken HAL7 und HAL8 in die Vertiefung gegeben. Um eine unspezifische Bindung der Phagen bzw. die Bindung der Phagen an den Fc-Teil des rekombinant hergestellten Antigen-Fc-Fusionsproteins zu verhindern, wurde zuvor eine Negativselektion durch Präadsorption der Phagen auf einem Negativantigen mit Fc-Teil in *Panning*-Block durchgeführt.

Nach der 2-stündigen Inkubation der Phagen bei Raumtemperatur erfolgte ein intensiver Waschschriff mit PBS-T, um schwach oder nicht gebundene Phagen aus der Kavität zu entfernen. Die gebundenen Phagen wurden durch Inkubation mit 200 µl Trypsin (10 µg/ml) für 30 min bei 37 °C eluiert. 10 µl dieser Phagenlösung wurden zur Titerbestimmung (siehe Abschnitt 4.3.5) verwendet. Die restlichen 190 µl wurden für die Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen und zur Amplifikation der Phagenpartikel genutzt (siehe Abschnitt 4.3.4). Insgesamt wurden 3 *Panning*-Runden durchgeführt, wobei für jede Runde 5 µg Antigen eingesetzt wurden, sowie die eluierten und amplifizierten Phagen aus der jeweils vorherigen *Panning*-Runde. Zusätzlich wurde in jeder Runde der Waschschriff zur Entfernung nicht oder schwach gebundener Phagen weiter intensiviert.

### 4.3.4 Infektion von *E. coli* und Produktion von Antikörperphagen

Nach der Elution der Phagen im *Panning* wurden diese zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen und zur Amplifikation der Phagenpartikel verwendet. Für die Infektion wurden die Bakterien in 10 ml 2 x YT-T-Medium bei 37 °C im Schüttelkolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden 4 x 135 µl dieser Suspension entnommen, in 4 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) überführt und jeweils 45 µl der eluierten Phagen pro Kavität hinzugegeben. Für die Infektion der Bakterien wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl einer 10 x Glucose-Ampicillin-Lösung pro Vertiefung wurde die Mikrotiterplatte über Nacht bei 30 °C und 850 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

Zur Produktion bzw. Amplifikation von Phagenpartikeln wurden je 5 µl der infizierten *E. coli*-Zellen pro Vertiefung entnommen und in einer neuen Mikrotiterplatte zu 195 µl 2 x YT-GA-Medium gegeben. Die Kulturen wurden ca. 2 h bei 37 °C und 850 rpm im Thermoschüttler bis zu einer OD<sub>620</sub> von 0,3 bis 0,4 kultiviert ( $OD_{600} = OD_{620} \times 1,6$ ). Danach wurden  $1 \times 10^9$  cfu des Helferphagen M13K07 in jede Kavität gegeben und die Bakterien für die Infektion für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und anschließend nochmals 30 min bei 37 °C und 850 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Für den Wechsel des Kulturmediums wurden die Bakterien für 10 min bei 3220 xg pelletiert, der Überstand entfernt und pro Vertiefung 180 µl 2 x YT-AK-Medium hinzugegeben. Nach Resuspension der Zellen wurden diese für die Phagenproduktion über Nacht bei 30 °C und 850 rpm im Thermoschüttler kultiviert.

Die Bakteriensuspension aus den vier zu einem *Panning* gegen ein Antigen gehörenden Vertiefungen wurde im Anschluss in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und für 10 min bei 16.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand, welcher die produzierten Phagen enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die nächste *Panning*-Runde wurden 50 µl dieser Phagensuspension verwendet sowie weitere 10 µl für die Titerbestimmung der amplifizierten Phagen eingesetzt.

#### 4.3.5 Titerbestimmung von M13K07-Phagen

Zur Bestimmung des Titers der eluierten und amplifizierten Phagen wurden *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen in 2 x YT-T-Medium bei 37 °C im Schüttelkolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Von der jeweiligen Phagensuspension wurden parallel Verdünnungsreihen in 1 x PBS hergestellt und je 10 µl dieser Verdünnungen zu 50 µl Zellen gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde für die Titerbestimmung der eluierten Phagen, der gesamte Ansatz auf einer 2 x YT-GA-Platte ausgestrichen. Für die Titerbestimmung der amplifizierten Phagen wurden pro Verdünnungsstufe 3 x 10 µl der Zellsuspension auf 2 x YT-GA-Platten ausgetropft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, die Kolonien anschließend ausgezählt und mit Hilfe des Verdünnungsfaktors der Phagentiter in Form von cfu/ml bestimmt. Die Titerplatten der eluierten Phagen aus *Panning*-Runde 2 und 3 wurden darüber hinaus zur Isolation selektierter Antikörperklone verwendet.

#### 4.3.6 Produktion von scFv-Antikörperfragmenten

Für die erste Überprüfung der Spezifität der mittels Phagen-Display und *Panning* selektierten Antikörperklone im Antigen-ELISA wurden diese in Mikrotiterplatten-Maßstab produziert. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte (Sarstedt) mit 150 µl 2 x YT-GA-Medium pro Vertiefung befüllt und mit Einzelkolonien von den Titerplatten der eluierten Phagen aus *Panning*-Runde 2 und 3 beimpft. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Pro Kavität wurden 20 µl der Kultur entnommen und in eine neue Mikrotiterplatte in 130 µl 2 x YT-GA-Medium überführt. Nach weiterer Kultivierung für 2 h bei 37 °C und 300 rpm, wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 3220 xg und Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Durch Resuspension des Zellpellets in 170 µl 2 x YT-A-Medium mit 50 µM IPTG pro Vertiefung wurde die Produktion von scFv-Antikörperfragmenten induziert und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm durchgeführt. Nach Zentrifugation der Kulturen für 10 min bei 3220 xg und Raumtemperatur wurde der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt und konnte direkt für einen Antigen-ELISA eingesetzt werden. In die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit den Zellpellets wurden jeweils 40 µl 80 % (v/v) Glycerin hinzugefügt und die Platte bei -80 °C gelagert.

## 4.4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie

#### 4.4.1.1. Reinigung von Proteinen mit HIS-Tag mittels IMAC

Rekombinante Fusionsproteine aus Antigen und HIS-Tag wurden nach der sekretorischen Produktion in HEK293-6E-Zellen mittels IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*) affinitätschromatografisch aus den Kulturüberständen gereinigt. Die Reinigungen wurden mit Hilfe des Profinia *Protein Purification* Systems (Bio-Rad) unter Verwendung einer 1 ml Nickel-Sepharose-Säule und einer 10 ml Gelfiltrationssäule zur Entsalzung durchgeführt. Vor der Reinigung wurde die Probe mit 5x konzentriertem Bindepuffer auf eine Endkonzentration von 10 mM Imidazol und 0,5 M Natriumchlorid eingestellt (entsprach einfachem Bindepuffer) und mit einem 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter filtriert. Die für die Reinigung verwendeten Puffer wurden ebenfalls mit einem 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter filtriert. Der Ablauf der Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurde die Probe mit einem 0,2µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.4.1.2. Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mittels Protein A (Profinia System)

Rekombinante Antikörper und Fusionsproteine mit humanem IgG1-Fc-Teil oder murinem IgG2c-Fc-Teil wurden nach der sekretorischen Produktion in HEK293-6E-Zellen mittels Protein A-Affinitätschromatografie aus den Kulturüberständen gereinigt. Hierfür wurde das Profinia *Protein Purification* System (Bio-Rad) mit einer 1 ml Protein A-Säule und einer 10 ml Gelfiltrationssäule zur Entsalzung verwendet. Die Probe sowie die verwendeten Puffer wurden vor der Reinigung mit einem 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter filtriert. Danach erfolgte die Reinigung entsprechend der Herstellerangaben. Die gereinigte Probe wurde mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

#### 4.4.1.3. Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mittels Protein A (ÄKTA Prime)

Alternativ zum Profinia *Protein Purification* System wurden affinitätschromatografische Reinigungen von rekombinanten Antikörpern mit Fc-Teil mittels Protein A mit dem ÄKTA Prime System (GE Healthcare) durchgeführt. Für die Reinigungen wurde eine 1 ml Protein A-Säule (HiTrap MabSelect SuRe von GE Healthcare) verwendet. Sämtliche Puffer sowie die Probe wurden vor der Reinigung mit einem 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter filtriert. Alle Schritte der Reinigung wurden mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min und einem maximalen Druck von 0,7 mPa durchgeführt.

Die Probe wurde nach Equilibrierung der Säule mit Bindepuffer auf diese geladen. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, sowie die Elution der Probe mit Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen. Zur Neutralisation des Eluats wurden jeweils 150 µl Neutralisationspuffer pro Fraktion in den Auffanggefäßen vorgelegt.

Die Fraktionen wurden anschließend zusammengeführt und für 2 h bei 4 °C gegen 5 l PBS dialysiert. Danach erfolgte ein Wechsel in 5 l frisches PBS und die Dialyse der Proben über Nacht bei 4 °C. Zur Lagerung der gereinigten Proben wurden diese im Anschluss an die Dialyse mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

#### 4.4.1.4. Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mittels Protein A (24 Well Platte)

Bei Produktionen von Antikörpern mit Fc-Teil im kleinen Maßstab (bis 10 ml) wurden die Kulturüberstände manuell unter Verwendung einer 24 *Well* Filterplatte gereinigt, welche pro Vertiefung 0,5 ml Protein A-Affinitätsmedium (MabSelect SuRe von GE Healthcare) enthält. Bei der Reinigung wurde die Flüssigkeit oder der Puffer durch Anlegen von Vakuum durch die Filterplatte und das darin enthaltene Protein A-Affinitätsmedium gesaugt.

Nach der Equilibrierung des Materials mit 2 x 5 ml Bindepuffer wurde die Probe geladen und für 10 min bei Raumtemperatur und Intervallschütteln bei 400 rpm (2 x 10 sec pro 1 min) inkubiert. Nach dem Durchtropfen der Probe durch die Filterplatte ohne Anlegen von Vakuum folgten zwei Waschschriffe mit 5 ml Waschpuffer 1 und 2,5 ml Waschpuffer 2, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der Probe erfolgte in 3 Schritten mit insgesamt 1,4 ml Elutionspuffer, wobei zunächst 400 µl Elutionspuffer zugefügt wurden und vor den Durchsaugen durch die Filterplatte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend erfolgten noch 2 weitere Elutionen mit jeweils 500 µl Elutionspuffer.

Zur Neutralisierung des Eluats in der Sammelplatte, einer *Deepwell*-Platte mit 24 Vertiefungen, wurden pro Vertiefung 150 µl Neutralisationslösung vorgelegt.

Das Umpuffern der Eluate wurde im Anschluss an die Reinigung mittels *Zeba Desalt Spin* Säulen (Thermo Fisher Scientific) und Zentrifugation durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säulen bei Raumtemperatur mit 3 x 2,5 ml 1 x PBS und 1000 xg wurde das Eluat aus der Protein A-affinitätschromatografischen Reinigung auf die Säule gegeben. Durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 xg und Raumtemperatur erfolgte das Umpuffern der Probe in 1 x PBS. Abschließend wurde die gereinigte Probe mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 4.4.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration gereinigter Proteinen erfolgte photometrisch mittels NanoDrop ND1.000 Spektrophotometer. Hierzu wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und unter Verwendung des molekularen Extinktionskoeffizienten und der molekularen Masse des Proteins die Konzentration berechnet. Der molekulare Extinktionskoeffizient sowie die molekulare Masse wurden zuvor mit Hilfe des Programms VectorNTI ermittelt.

### 4.4.3 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

#### 4.4.3.1. *Human Capture ELISA*

Zur Bestimmung der Konzentration nicht gereinigter Proteine mit humanem Fc-Teil wurde ein *Human Capture ELISA* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst je 100 µl des polyvalenten Antikörpermischs Ziege α-human IgG (Fc-spezifisch; 1:6700 in 1 x PBS verdünnt) als Fängerantikörper in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Costar) gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert (*Coating*). Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurden anschließend 200 µl 1 x PBS mit 30 % FCS in jede Vertiefung gefüllt und die Platte erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. In einer weiteren Mikrotiterplatte wurden parallel Vorverdünnungen von Kulturüberständen aus einer sekretorischen Antikörperproduktion in HEK293-6E-Zellen (siehe Abschnitt 4.6.4.1) in 1 x PBS mit 1 % FCS vorbereitet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zusätzlich eine Vorverdünnungsreihe des *Human N Protein Standard SL* (Siemens) in 1 x PBS mit 1 % FCS erstellt. Nach dem Blocken der



Mikrotiterplatte mit dem immobilisierten Fängerantikörper folgte ein Waschschrift mit PBS-T am ELISA-Washer. Die Vertiefungen wurden im Anschluss mit 100 µl 1 x PBS mit 1 % FCS befüllt und je 100 µl der Vorverdünnungen der Kulturüberstände und des Standards hinzugegeben. Nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die Platte erneut am ELISA-Washer gewaschen und in jede Kavität 100 µl des Nachweisantikörpers Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) HRP-konjugiert (1:70.000 in 1 x PBS mit 1 % FCS) gefüllt. Die Platte wurde nochmals für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach am ELISA-Washer gewaschen. Im Anschluss wurden in jede Vertiefung 100 µl einer TMB-Substratlösung gegeben und die Farbreaktion nach 20 min durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Zugabe der Schwefelsäure bewirkt einen Farbumschlag von blau zu gelb. Die Absorption des gebildeten Farbstoffs wurde am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzmessung bei 620 nm) vermessen.

#### **4.4.3.2. Indirekter Antigen-ELISA**

Für den indirekten Antigen-ELISA wurde eine Mikrotiterplatte (Costar) mit 200 ng Antigen in 100 µl 1 x PBS pro Vertiefung befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (*Coating*). Anschließend wurde das Antigen durch Ausschlagen entfernt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Kavitäten jeweils mit 300 µl Blocklösung gefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platte mit PBS-T am ELISA-Washer erfolgte die Zugabe von 100 µl löslichen Antikörpern in Blocklösung pro Vertiefung aus einer Produktion in Mikrotiterplatten (siehe Abschnitt 4.3.6). Die Mikrotiterplatte wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut am ELISA-Washer gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation der Platte mit 100 µl des primären Nachweisantikörpers Maus  $\alpha$ -c-Myc-Tag (9E10; 1:2000 in Blocklösung) pro Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Nach dem Waschen wurden in jede Kavität 100 µl des sekundären Nachweisantikörpers Ziege  $\alpha$ -Maus IgG (Fab-spezifisch) HRP-konjugiert (1:50.000 in Blocklösung) gegeben und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend erneut gewaschen und in jede Vertiefung 100 µl einer TMB-Substratlösung gegeben. Die Farbreaktion wurde nach 20 min durch Zugabe von 100 µl 0,5 M Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt und bewirkte einen Farbumschlag von blau zu gelb. Die Absorption des gebildeten Farbstoffs wurde anschließend am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzmessung bei 620 nm) vermessen.

### 4.4.3.3. Titrations-ELISA

Für den Titrations-ELISA wurden jeweils 100 ng Antigen in 100 µl 1 x PBS in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Costar) gegeben und über Nacht bei 4 °C immobilisiert (*Coating*). Nach dem Ausschlagen des Antigens wurden freie Bindungsstellen in den Kavitäten durch Füllen mit 300 µl Blocklösung und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem Waschschrift am ELISA-*Washer* erfolgte die Zugabe von 100 µl löslicher Antikörper im scFv-Fc-Format pro Kavität. Von den Antikörpern wurde zuvor ausgehend von einer Konzentration von 10 µg/ml eine 11-stufige Verdünnungsreihe in Blocklösung hergestellt und diese im Titrations-ELISA eingesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer Waschschrift und die Inkubation der Platte mit 100 µl des Nachweisantikörpers Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) HRP-konjugiert (1:70.000 in Blocklösung) pro Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur. Die Platte wurde anschließend erneut gewaschen und 100 µl einer TMB-Substratlösung in jede Kavität gegeben. Nach 10-15 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl 0,5 M Schwefelsäure pro Vertiefung abgestoppt. Die Zugabe der Schwefelsäure bewirkte einen Farbumschlag von blau zu gelb. Die Absorption des Farbstoffs wurde anschließend am ELISA-*Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen.

### 4.4.4 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Durchführung einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurden zunächst Polyacrylamidgele, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.21 dargestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen, in welches zusätzlich ein Kamm für die spätere Beladung des Gels mit Proben eingesetzt wurde. Der Kamm wurde nach der Polymerisierung des Sammelgels entfernt und das fertige Polyacrylamidgel in eine mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer gesetzt.

Die Proben wurden vor der Beladung des Gels zur Denaturierung mit 5 x Laemmli-puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Darüber hinaus wurden Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen hergestellt, indem 5 x Ladepuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol zu

den Proben gegeben wurde und diese anschließend für 10 min bei 56 °C erhitzt wurden. Das Gel wurde neben den Proben mit ein Proteinmarker (molarer Massenstandard) beladen und die elektrophoretische Auftrennung der Proteine für 50 min bei 200 V und 400 mA durchgeführt.

**Tabelle 4.21 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]		
	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
dH <sub>2</sub> O	1.600	1.300	1.000
30 % Acrylamidmix	1.300	1.600	260
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1.000	1.000	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	200
10 % SDS	40	40	15
10 % APS	40	40	15
TEMED	2	2	2

#### 4.4.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele zur Anfärbung der Proteine in Coomassie-Färbelösung gegeben und in der Mikrowelle erhitzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf einer Wippe bei Raumtemperatur wurden die Gele mit dH<sub>2</sub>O gespült und in Entfärbelösung gelegt. Nach dem erneuten Erhitzen in der Mikrowelle wurden die Proteingele auf einer Wippe bei RT bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden entfärbt (ca. 20 min). Die Lagerung der Gele erfolgte anschließend in dH<sub>2</sub>O.

#### 4.4.6 Western Blot

Mittels Western Blot wurden Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde das *Semi-Dry*-Verfahren verwendet. Zunächst wurde ein Filterpapier in Laufpuffer getränkt und auf eine Blotanlage gelegt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und auf das Filterpapier gegeben. Auf die Membran wurde das Polyacrylamidgel gelegt, gefolgt von einem weiteren in Laufpuffer getränkten Filterpapier. Zwischen allen Schichten wurden mögliche Luftblasen entfernt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte nach dem Schließen der Transferkammer durch Anlegen eines elektrischen Feldes für 30 min bei 20 V und 0,4 A.

### 4.4.7 Immunfärbung

Die Immunfärbung diente zum spezifischen Nachweis der Proteine nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran zunächst über Nacht bei 4 °C in Blocklösung inkubiert und anschließend in PBS-T gewaschen. Zum Nachweis von scFv-Antikörperfragmenten wurde die Membran für 1,5 h bei Raumtemperatur mit dem primären Nachweisantikörper Maus  $\alpha$ -c-Myc-Tag (1:1.000 in Blocklösung) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Nachweisantikörper Ziege  $\alpha$ -Maus IgG (Fab-spezifisch) AP-konjugiert (1:30.000 in Blocklösung) für 1,5 h bei Raumtemperatur.

Der Nachweis der spezifischen Antigenbindung auf Zelllysaten erfolgte durch Inkubation der Membran mit 1  $\mu$ g/ml gereinigtem Antikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur, einem Waschschrift mit PBS-T und der erneuten Inkubation für 1,5 h bei Raumtemperatur mit dem Nachweisantikörper Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) AP-konjugiert (1:5.000 in Blocklösung).

Anschließend wurde die Membran nochmals mit PBS-T und zusätzlich mit Substratpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den Substraten NBT und BCIP (1:100 in Substratpuffer verdünnt). Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Färbung durch Spülen mit dH<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

## 4.5 Biophysikalische Methoden

### 4.5.1 Größenausschlusschromatografie (SEC)

Die Größenausschlusschromatografie (SEC) wurde mit dem ÄKTA Purifier System (GE Healthcare) unter Verwendung einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Für jeden Chromatografielauf wurden 80  $\mu$ g Probe in einem Volumen von 150 - 500  $\mu$ l auf die Säule geladen. Als Proben- und Laufpuffer wurde 1 x PBS verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Für die Auswertung wurde die Absorption der Proben bei 280 nm analysiert.

#### 4.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die Bindungskinetik und Affinität der Antikörper zum jeweiligen Antigen wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz-Messung am Biacore System (GE-Healthcare) untersucht. Zunächst wurde ein CM5-Chip nach Herstellerangaben mit dem *Human Antibody Capture* Kit (GE-Healthcare) vorbereitet. Der jeweilige Antikörper wurde mit einer Konzentration von 5 µg/ml und einer Flussrate von 10 µl/min durch Bindung des humanen Fc-Teils an den Fängerantikörper als Ligand immobilisiert. Anschließend erfolgte die Messung mit dem Antigen als Analyt in einer Konzentrationsreihe bei einer Flussrate von 25 µl/min. Die Assoziationszeit wurde auf 250 s festgelegt. Die Dissoziation wurde mit Laufpuffer (PBS-T) durchgeführt und betrug 600 s.

Für die Verwendung eines Antigens als Ligand wurde eine Aminkopplung an einen CM5-Chips durchgeführt. Vor der Kopplung erfolgte ein *pH-Scouting* mit Acetatpuffer mit verschiedenen pH-Werten (pH 3,5, 4,0 oder 4,5) sowie verschiedenen Antigenkonzentrationen (10 µg/ml, 2 µg/ml und 1 µg/ml).

Für die Kopplung wurde die Chipoberfläche zunächst mit NHS/EDC aktiviert. Entsprechend der Ergebnisse des *pH-Scoutings* wurde das Antigen anschließend in einer Konzentration von 2 µg/ml in Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,5 bis zu 216 RU gekoppelt. Verbliebene freie Bindungsstellen auf der Chipoberfläche wurden unspezifisch mit 1 M Ethanolamin pH 8,5 abgesättigt. Die Messungen erfolgten mit dem Antikörper als Analyt in einer Konzentrationsreihe bei einer Flussrate von 25 µl/min. Die Assoziationszeit betrug 250 s, während die Dissoziation mit Laufpuffer (PBS-T) auf 600 s festgelegt wurde.

### 4.6 Zellbiologische Methoden

#### 4.6.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung der Suspensionszelllinie HEK293-6E erfolgte in Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit Ventildeckel bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 110 rpm oder in Polypropylen-Röhrchen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 190 rpm. Als Kulturmedium wurde F17-Kulturmedium verwendet (siehe Tabelle 4.5). Die Zelldichte wurde alle zwei bis drei Tage bestimmt (siehe Abschnitt 4.6.2) und die Zellzahl für die Subkultivierung auf 125.000 - 250.000 Zellen/ml eingestellt.

Adhärente Tumorzelllinien wurden in DMEM-Kulturmedium (HeLa, SKOV-3, LOVO, SW403) oder RPMI 1640-Kulturmedium (MSTO-211H, T-47D, LS-174T; siehe Tabelle 4.5) in Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage bei Konfluenz der Kultur. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Nach Aufnahme der Zellen in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium wurde die Zelldichte bestimmt (siehe Abschnitt 4.6.2) und die Zellen in neuen Zellkulturschalen ausgesät.

Die Kultivierung der Lymphom-Zelllinie NK-92 erfolgte in Suspension in Zellkulturplatten, -schalen oder T-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Als Medium wurde Alpha-MEM-Kulturmedium (siehe Tabelle 4.5) verwendet. Für die Subkultivierung wurden die Zellen jeden zweiten Tag in ein Polypropylen-Röhrchen überführt und für 5 min bei 850 rpm (145 xg) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Nach Ermittlung der Zelldichte (siehe Abschnitt 4.6.2) wurde für die Subkultivierung eine Zellzahl von 500.000 Zellen/ml eingestellt.

#### 4.6.2 Bestimmung der Zelldichte und der Zellvitalität (Trypanblau-Ausschluss)

Zur Beurteilung der Vitalität der kultivierten Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt, einem Farbstoff, der nur tote Zellen anfärbt. Anschließend wurde die Anzahl lebender Zellen mittels Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anhand der ermittelten Zellzahl wurde die Zelldichte in Zellen/ml berechnet.

### **4.6.3 Lagerung von Zelllinien**

Für die Langzeitlagerung der Zelllinien wurden Cryo-Kulturen angelegt. Hierzu wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben geerntet und für 4 min bei 145 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in kaltem Medium mit 40 % FCS resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zelldichte und Vitalität wurde kaltes Medium mit 20 % DMSO hinzugefügt, sodass das Medium final 20 % FCS und 10 % DMSO enthält. Anschließend wurden die Zellen in Mikroschraubröhrchen gegeben und in einem Cryo-Container bei -80 °C graduell eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und für die Kultivierung ausgesät.

### **4.6.4 Transiente Transfektion von HEK293-6E-Zellen**

#### **4.6.4.1. Transiente Transfektion zur sekretorischen Produktion von rekombinanten Proteinen**

Zur sekretorischen Produktion von verschiedenen rekombinanten Proteinen wurden transiente Transfektionen von HEK293-6E-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz PEI (Polyethylenimin) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Zelldichte von  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit DNA-PEI-Komplexen transfiziert. Die DNA-PEI-Komplexe wurden zuvor hergestellt, indem in einer Polystyrol-Platte 25 µg Plasmid-DNA und 62,5 µl PEI (1 mg/ml) separat voneinander in 1,25 ml F17-Transfektionsmedium (siehe Tabelle 4.5) gegeben wurden. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils ein Ansatz mit DNA-PEI-Komplexen zu 125 ml Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 110 rpm kultiviert. Bei Produktionen in kleinerem Maßstab wurden die DNA-PEI-Ansätze entsprechend herunterskaliert. 48 h nach der Transfektion wurden die Kulturen zur Hälfte des Kulturvolumens mit frischem F17-Kulturmedium mit 0,5 % (w/v) TN1 versetzt. Nach weiteren 72 - 96 h erfolgte die Ernte der Kulturüberstände, indem die Zellsuspensionen in Polypropylen-Röhrchen überführt wurden und für 10 min bei 800 xg und 6 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde anschließend in neue Polypropylen-Röhrchen überführt und

direkt für die Reinigung der Proteine mittels Protein-A oder IMAC (siehe Abschnitt 4.4.1) verwendet oder im *Human Capture* ELISA eingesetzt. Wurde die Reinigung nicht direkt im Anschluss durchgeführt, wurden die Überstände mit 1 % *low* IgG FCS versetzt und bei 4 °C gelagert.

### **4.6.4.2. Expression von rekombinanten Proteinen auf der Oberfläche von HEK293-6E-Zellen**

Für die Expression von rekombinanten Proteinen auf der Oberfläche von HEK293-6E-Zellen wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.6.4.1 beschrieben transient mit Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz PEI transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Zelldichte erneut bestimmt und es erfolgte die Ernte der Zellen durch Überführen in ein Polypropylenröhrchen und Zentrifugation für 6 min bei 250 xg und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung in kaltem 1 x PBS (z.B. zur Herstellung von Proben für die SDS-PAGE) oder Färbepuffer (für die Durchflusszytometrie) resuspendiert.

### **4.6.5 Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie**

Die Bindung von Antikörpern auf der Oberfläche von verschiedenen Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Adhärenz Zelllinien wurden wie in Abschnitt 4.6.1 mittels Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und in Kulturmedium aufgenommen. In Suspension wachsende Zelllinien konnten direkt für die Färbung verwendet werden. Die Zelldichte wurde durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abschnitt 4.6.2) bestimmt und die Zellsuspension anschließend für 6 min bei 250 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in kaltem Färbepuffer aufgenommen. Je 200.000 Zellen wurden pro Färbung in die Vertiefung einer Polystyrol-Mikrotiterplatte mit V-Boden (Ritter) gegeben und die Platte für 6 min bei 300 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach Ausschlagen des Überstands wurden in jede Vertiefung 5 µg des zu testenden Antikörpers (in 200 µl Färbepuffer) gegeben. Zum Nachweis des FLAG-Tags des Antigens DAP10 wurden 5 µg des primären Nachweisantikörpers Maus  $\alpha$ -FLAG *Clone* M2 in 200 µl Färbepuffer verwendet. Die Zellen wurden nach dem Resuspendieren für 30 min bei 4-8 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte für 6 min bei 300 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen.



Es folgte ein Waschschrift durch Resuspendieren der Zellen in 200 µl Färbepuffer und Zentrifugation für 6 min bei 300 xg und 4 °C. Nach Ausschlagen des Überstands wurden 50 µl des Nachweisantikörpers Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc $\gamma$ -spezifisch) FITC-konjugiert (1:100 verdünnt in Färbepuffer) bzw. 50 µl des sekundären Nachweisantikörpers Ziege  $\alpha$ -Maus IgG (Fc-spezifisch) FITC-konjugiert (1:500 verdünnt in Färbepuffer) in jede Kavität gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4-8 °C wurden in jede Vertiefung 300 µl Färbepuffer gegeben und die Platte für 6 min bei 300 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen und die Zellen in 200 µl Färbepuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension für die durchflusszytometrische Messung in ein Polypropylenröhrchen (Sarstedt) überführt, in welches zuvor 200 µl einer 2x Propidiumiodid-Lösung vorgelegt wurden. Propidiumiodid interkaliert in die DNA geschädigter Zellen und diente zur Unterscheidung lebender und toter Zellen während der Messungen. Die Vermessung der Proben wurde am Durchflusszytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt.

#### **4.6.6 Isolation von peripheren Blutlymphozyten**

Für funktionelle Analysen wurden periphere Blutlymphozyten aus dem Humanblut gesunder Spender isoliert. Hierfür wurden LRS-Kammern (Leukozytenreduktionssystem) aus der Blutspende verwendet. In einem Polypropylen-Röhrchen (Corning) wurden 20 ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) vorgelegt und mit 10 ml Zellsuspension aus einer LRS-Kammer überschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation für 20 min bei 805 xg und Raumtemperatur sowie abgeschalteter Bremse wurde die Interphase, welche die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) enthält, abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, in das bereits 10 ml HBSS (*Hank's balanced salt solution*) vorgelegt wurden. Nach dem Auffüllen des Röhrchens mit HBSS auf 50 ml folgte die Zentrifugation für 10 min bei 290 xg und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut durch Aufnahme in 50 ml HBSS und Zentrifugation für 10 min bei 290 xg und Raumtemperatur gewaschen. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Zellen und dem Vereinigen der Zellen, die aus einer LRS-Kammer stammen, wurden diese in 40 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 290 xg und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die Zellen für die Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt 4.6.2)

in 50 ml HBSS aufgenommen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 290 xg und Raumtemperatur wurden die Zellen in RPMI 1640-Kulturmedium (siehe Tabelle 4.5) aufgenommen, auf eine Zelldichte von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in eine Gewebekulturflasche überführt. Durch Kultivierung der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhären die in der Zellsuspension enthaltenen Monozyten an der Oberfläche der Kulturfläche. Am folgenden Tag wurden die in Suspension befindlichen peripheren Blutlymphozyten aus der Gewebekulturflasche abgenommen und für funktionelle Analysen eingesetzt.

### 4.6.7 Calcein-AM-Zytotoxizitätsassay

Zur Untersuchung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) wurde die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM (Calcein-Acetoxymethylester; Neri *et al*, 2001) durch Zelllyse analysiert. Für den Assay wurden die Zielzellen, eine adhäre Tumorzelllinie, mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst (siehe Abschnitt 4.6.1) und in RPMI 1640-Kulturmedium (siehe Tabelle 4.5) aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zelldichte (siehe Abschnitt 4.6.2) wurden die Zellen in einem Polypropylen-Röhrchen (Corning) für 6 min bei 163 xg (900 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml RPMI 1640-Kulturmedium mit 15 µM Calcein-AM aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Parallel wurden von den zu testenden Antikörpern Verdünnungsreihen in RPMI 1640-Kulturmedium in äquimolaren Mengen hergestellt. Darüber hinaus wurde die Zellzahl der Effektorzellen für den Assay (periphere Blutlymphozyten; siehe Abschnitt 4.6.6) ermittelt (siehe Abschnitt 4.6.2) und ebenfalls eine Verdünnungsreihe der Zellen ausgehend von  $8 \times 10^6$  Zellen/ml vorbereitet.

Nach der 30 minütigen Inkubation der Zielzellen wurde das Röhrchen mit RPMI 1640-Kulturmedium aufgefüllt und für 6 min bei 163 xg (900 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei weitere Waschschrte, bei denen die Zellen jeweils in 12 ml RPMI 1640-Kulturmedium resuspendiert wurden und anschließend für 6 min bei 163 xg (900 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Vor der zweiten Zentrifugation wurden die Zellen nochmals für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in RPMI 1640-Kulturmedium aufgenommen und erneut die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 4.6.2).

Nach Einstellen der Zellzahl auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml wurden je 50  $\mu\text{l}$  der Zielzellsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  der Antikörperverdünnungen und 50  $\mu\text{l}$  der Effektorzellverdünnungen in eine Polystyrol-Mikrotiterplatte mit U-Boden (Greiner) gegeben. Zur Ermittlung des maximalen Signals wurden die Zielzellen mit 2 % Triton X 100 in 1 x PBS (v/v) versetzt. Die Platte wurde anschließend für 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Vermessung der Proben wurde die Platte nach der Inkubation für 6 min bei 300 xg und Raumtemperatur zentrifugiert und 75  $\mu\text{l}$  des Überstands in eine schwarze Mikrotiterplatte mit Flachboden (Greiner) überführt. Die Messung der Fluoreszenzintensität der Proben wurde am Tecan Ultra bei einer Wellenlänge von 485 nm durchgeführt.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 ScFv-Antikörper für die Generierung unterschiedlicher mono- und bispezifischer Formate

Ausgangspunkt für die Generierung von mono- und bispezifischen humanen Antikörpern bildeten scFv-Fragmente aus den Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 (Hust *et al*, 2011). Das Antikörperfragment SUW59-A8 wurden im Rahmen der eigenen Masterarbeit mittels Phagendisplay und *Panning* gegen das Tumor-assoziierte Antigen CEA selektiert. Das scFv-Fragment SUW119-H2 wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem *Panning* auf gleiche Weise gegen CEA selektiert (Daten nicht gezeigt). Die Selektion beinhaltete bei CEA eine Negativselektion der Phagenbibliothek gegen CEACAM1, einem weiteren Mitglied aus der CEACAM-Familie der Karzinoembryonalen Antigene mit hoher Sequenzhomologie. Antikörperfragmente, welche spezifisch an den NK-Zellrezeptor NKG2D binden, wurden ebenfalls im Rahmen der Masterarbeit von Sylvia Dietrich aus den genannten Bibliotheken selektiert. Für die Selektion von NKG2D-spezifischen Antikörpern wurde eine Negativselektion gegen den NK-Zellrezeptor NKG2A durchgeführt. NKG2A gehört wie NKG2D zur Familie der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren. Sämtliche Antigene lagen für die Selektionen als Fc-Fusionsproteine vor und wurden zuvor sekretorisch in HEK293-6E Zellen produziert. Die spezifische Bindung wurde anschließend mittels Antigen-ELISA überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die cDNA der Antigene CEA und CEACAM1 wurde von Dr. Zoltán Konthur zur Verfügung gestellt und entstammt der hORFeome Kollektion, einer Sammlung humaner offener Leseraster (ORF; Rual *et al*, 2005; Lamesch *et al*, 2007). In der zugehörigen Datenbank (Human ORFeome V5.1) sind die Sequenzen beider Antigene unter den Nummern BC034671 für CEA und BC014473 für CEACAM1 hinterlegt. Die cDNA der Antigene NKG2D und NKG2A wurde von Dr. Thomas Schirrmann bereitgestellt und entsprach der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen: Gene ID 22914 für NKG2D und Gene ID 3821 für NKG2A. Die Übereinstimmung wurde mittels *Alignment* der vorhandenen Sequenzen überprüft.

Im Anschluss an die Selektion wurden die Sequenzen der isolierten scFv-Antikörper bioinformatisch mit VBASE2 (Retter *et al*, 2005; Mollova *et al*, 2007) ausgewertet. Die humanen Antikörper-Keimbahnlinien der Gensegmente V(D)J für V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> sind in Tabelle 5.1 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 5.1 Mittels Phagendisplay selektierte scFv-Antikörper und zugehörige Keimbahnlinien**

Antigen	scFv-Klon	V V <sub>H</sub>	D V <sub>H</sub>	J V <sub>H</sub>	V V <sub>L</sub>	J V <sub>L</sub>
CEA	SUW59-A8	IGHV1-8*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*01
	SUW119-H2	IGHV3-53*01	IGHD2-8*02	IGHJ4*02	IGLV1-47*02	IGLJ3*02
	SyD7-H2	IGHV3-7*01	IGHD3-10*02	IGHJ1*01	IGLV2-14*04	IGLJ3*01
NKG2D	SyD99-B5	IGHV3-30*04	IGHD5-5*01	IGHJ4*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
	SyD99-B8	IGHV3-30*01	IGHD5-18*01	IGHJ4*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*01
	SyD99-C1	IGHV1-69*06	IGHD3-10*02	IGHJ6*02	IGLV1-44*01	IGLJ3*02
	SyD101-E7	IGHV3-48*02	IGHD4-23*01	IGHJ3*02	IGLV3-21*03	IGLJ3*01

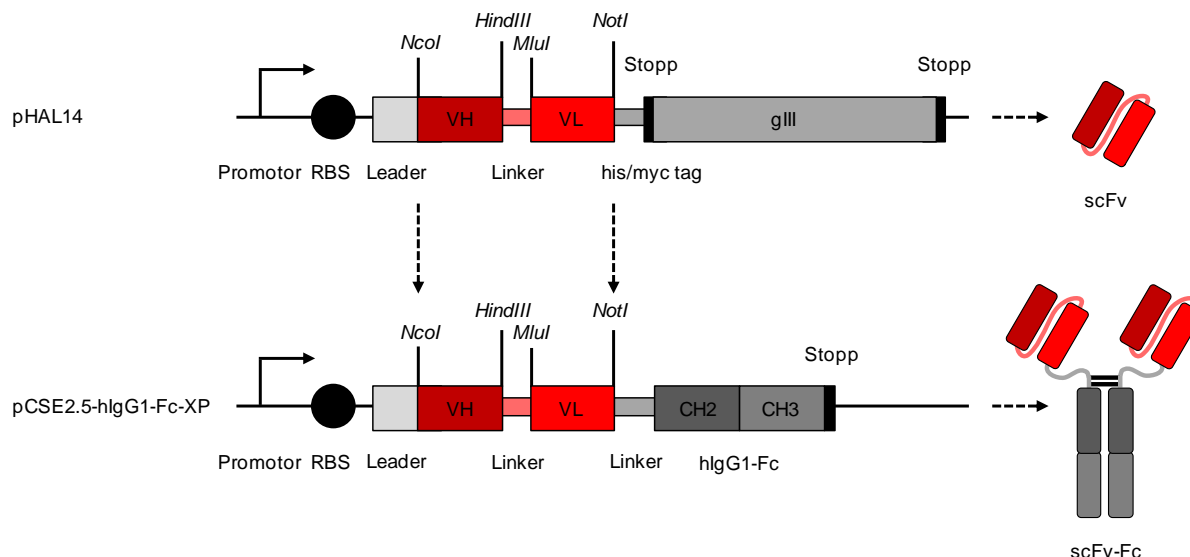
## 5.2 Klonierung und Charakterisierung CEA-spezifischer scFv-Fc-Antikörper

Die CEA-spezifischen scFv-Antikörper wurden für die weiteren Analysen in das IgG-equivalente bivalente scFv-Fc-Format mit humanem IgG1-Fc überführt. Die scFv-Klone wurden hierzu mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* aus dem Phagemidvektor pHAL14 (Pelat *et al*, 2007) in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP (Jäger *et al*, 2013) kloniert (siehe Abbildung 5.1).

Für die sekretorische Produktion wurden HEK293-6E Zellen transient mit dem Expressionsvektor transfiziert und der Produktionsüberstand mittels Protein A-Affinitätschromatografie gereinigt. Für den Antikörper SUW59-A8 wurden die Klonierung und Produktion bereits im Rahmen der eigenen Masterarbeit durchgeführt.

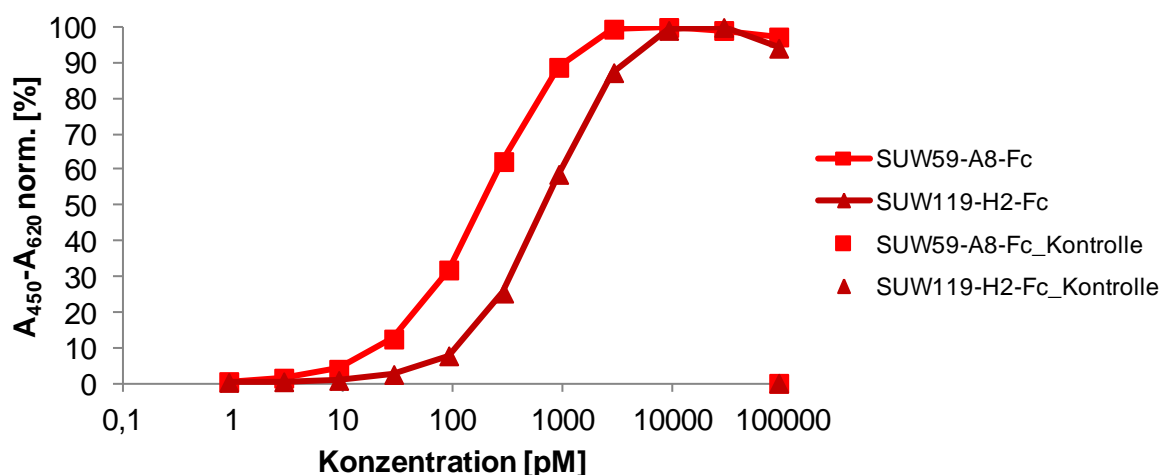
Die spezifische Antigenbindung der scFv-Fc-Fusionsproteine SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc wurde mittels Titrations-ELISA überprüft. Hierzu wurde das Tumor-assoziierte Antigen CEA in zwei Varianten - als Maus-IgG2c-Fc-Fusionsprotein oder mit HIS-Tag - verwendet. Als Negativkontrolle wurden BSA und der murine IgG2c-Fc im ELISA eingesetzt. Im Titrations-ELISA wurde eine spezifische und auf beiden CEA-Varianten vergleichbare Antigenbindung festgestellt. Beide Antikörper wiesen keine unspezifische Bindung an die

Kontrollantigene (BSA und Maus-IgG2c-Fc) auf. Der Antikörper SUW59-A8-Fc erreichte seine halbmaximale Antigenbindung bei geringeren Konzentrationen als der Antikörper SUW119-H2-Fc (siehe Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.1 Klonierungskassetten der Vektoren pHAL14 und pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP**

Das Phagemid pHAL14 kann zur Selektion von scFv-Antikörpern mittels Phagendisplay und zur periplasmatischen Produktion in *E. coli* eingesetzt werden. Durch Restriktion mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* ist eine direkte Klonierung des scFv-Fragments in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP (mit humanem IgG1-Fc) und die sekretorische Produktion von bivalenten scFv-Fc-Fusionsproteinen in HEK293-6E möglich.



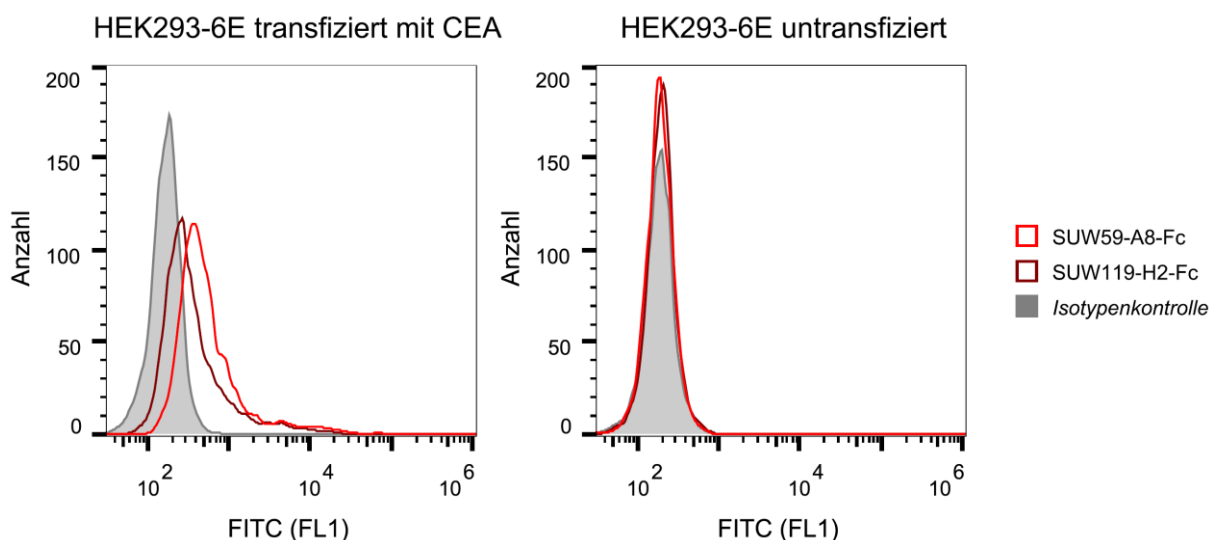
**Abbildung 5.2 Titrations-ELISA mit CEA-spezifischen scFv-Fc-Antikörpern**

In jeder Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurden 100 ng Antigen (CEA-HIS) immobilisiert. Nach der Titration der scFv-Fc-Antikörper erfolgte der Nachweis über einen HRP-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und das Substrat TMB. Auf dem Kontrollantigen BSA wurden die Antikörper nur in der höchsten Konzentration getestet.

### 5.2.1 Antigenpezifität auf HEK293-6E Zellen

Um die Spezifität der scFv-Fc-Antikörper und ihre Reaktivität mit den Antigenen auf der lebenden Zelle in Gegenwart einer Vielzahl an humanen Proteinen zu testen, wurde die Antigenbindung auf HEK293-6E-Zellen untersucht. HEK293-6E-Zellen wurden dafür transient mit dem vollständigen Antigen CEA transfiziert. Die Gesamt-cDNA des Antigens wurde zuvor in den Vektor pCSE2.5-XP kloniert. Die CEA-transfizierte bzw. untransfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und für Durchflusszytometrie und Western Blot mit Immunfärbung verwendet. Bei der Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie wurden ungereinigte Antikörperproduktionsüberstände verwendet. Der Erfolg der scFv-Fc-Produktion wurde zuvor mittels Western Blot mit Immunfärbung (siehe Anhang Abbildung 8.1) und *Human Capture* ELISA (siehe Anhang Abbildung 8.2) überprüft. Die Konzentrationsbestimmung im *Human Capture* ELISA ergab, dass vergleichbare Konzentrationen beider Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt wurden. Die Immunfärbung des Western Blots wurde mit gereinigten scFv-Fc-Antikörpern durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass CEA-transfizierte HEK293-6E-Zellen mit beiden CEA-spezifischen scFv-Fc-Antikörpern gefärbt wurden (siehe Abbildung 5.3).



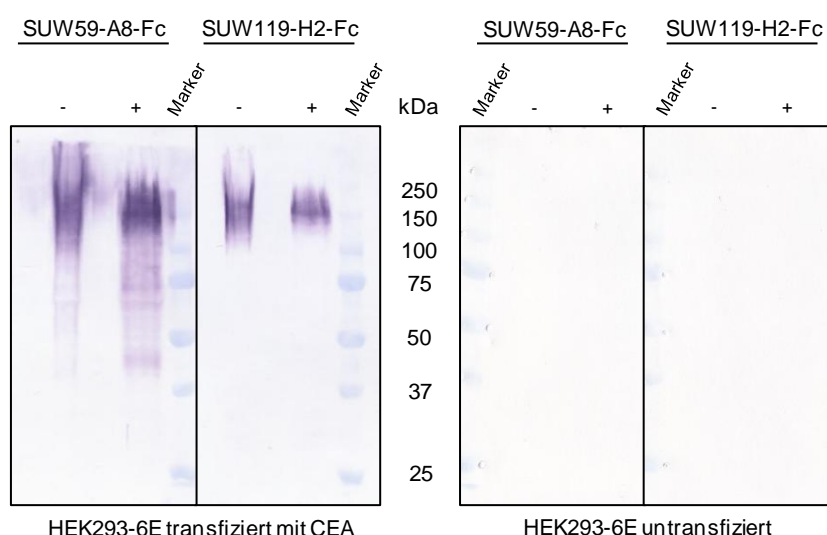
**Abbildung 5.3 Analyse der scFv-Fc-Antikörper SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc mittels Durchflusszytometrie auf HEK293-6E-Zellen**

Für den Versuch wurden untransfizierte und transient mit CEA transfizierte HEK293-6E-Zellen verwendet. 48 h nach der Transfektion bzw. untransfiziert wurden je 200.000 Zellen mit Kulturüberstand der sekretorischen scFv-Fc-Produktion und einem FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper gefärbt. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen analysiert.



Gleichzeitig wurden die untransfizierten Zellen nicht gefärbt. Daher ist davon auszugehen, dass zum einen das Antigen CEA von den transfizierten Zellen exprimiert wird und zum anderen beide Antikörper spezifisch daran binden.

Um neben der Spezifität auch die Art des gebundenen Epitops - konformationell oder linear - zu untersuchen, wurde ein Western Blot mit Immunfärbung der Zelllysate von CEA-transfizierten und untransfizierten HEK293-6E-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 5.4). Die Lysate wurden unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen vorbehandelt. Beide Antikörper banden in einem Bereich, der der molekularen Masse von ca. 180 kDa von CEA entspricht, wobei die Unschärfe der Banden auf starke und heterogene Glykosylierung des Antigens hinwies. Beim Test auf untransfizierten HEK293-6E-Zellen war keine unspezifische Bindung nachweisbar. Da beide Antikörper an das vollständig reduzierte Antigen binden, ist davon auszugehen, dass lineare Epitope erkannt werden.



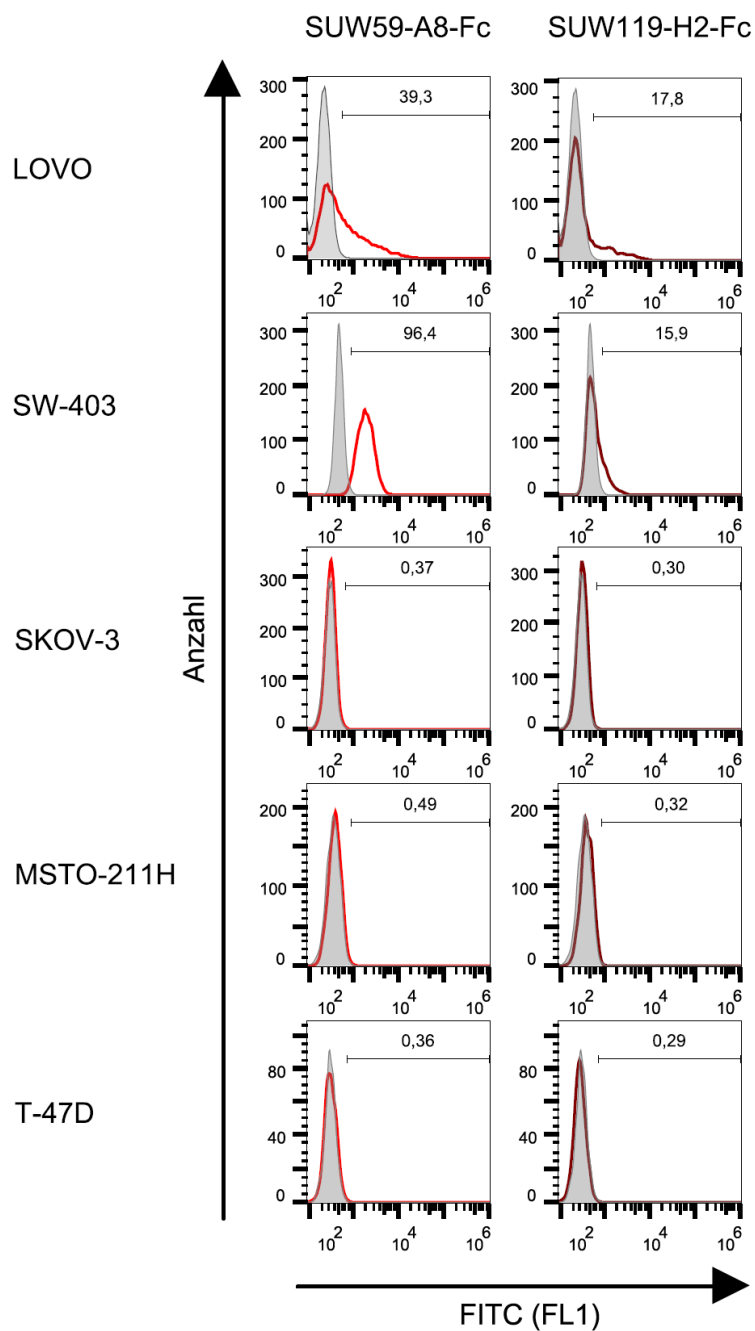
**Abbildung 5.4 Western Blot mit Immunfärbung zur Überprüfung der Antigen-spezifität und Art des gebundenen Epitops**

In einem 10 % igen SDS-PAA-Gel wurde pro Spur das Lysat von 50.000 CEA-transfizierten oder untransfizierten HEK293-6E-Zellen aufgetrennt. Die Lysate wurden unter reduzierenden (+) oder nicht reduzierenden (-) Bedingungen vorbehandelt. Nach dem Western Blot erfolgte die Immunfärbung mit jeweils 1 µg/ml gereinigtem scFv-Fc-Antikörper pro Membran (10 µg gesamt), einem AP-konjugiertem Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und dem Substrat NBT/BCIP.

### 5.2.2 CEA-Spezifität der Antikörper auf Tumorzelllinien

In den bisherigen Versuchen wurde die Antigenspezifität auf dem rekombinant hergestellten CEA getestet. Mittels Durchflusszytometrie und Western Blot mit Immunfärbung auf verschiedenen Tumorzelllinien wurde nun die Spezifität zum endogen exprimierten CEA analysiert. Für die Versuche wurden zwei Tumorzelllinien gewählt, für die die endogene CEA-Expression beschrieben ist. Dabei handelte es sich um die Kolonkarzinom-Zelllinien LOVO (Schirrmann & Pecher, 2002) und SW-403 (Leibovitz *et al*, 1976; Drewinko *et al*, 1984). Neben den CEA-exprimierenden Zelllinien wurden drei Zelllinien verwendet, die kein CEA exprimieren: SKOV-3 (Ovarialkarzinom; Buick *et al*, 1985; Dorvillius *et al*, 2002), MSTO-211H (Mesotheliom; Bepler *et al*, 1987; Yanagihara *et al*, 2010) und T-47D (Mammakarzinom; Majuri *et al*, 1994).

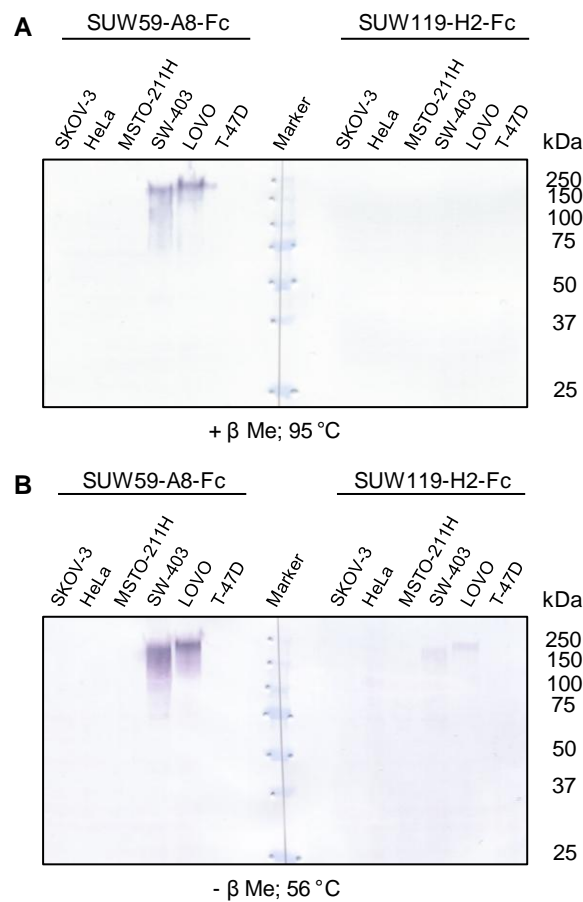
In der durchflusszytometrischen Analyse konnte die spezifische Bindung des Antikörpers SUW59-A8-Fc an das Antigen auf der Oberfläche der CEA-exprimierenden Zelllinien LOVO und SW-403 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.5). Der Anteil an gefärbten Zellen unterschied sich mit 39,3 % bei LOVO und 96,4 % bei SW-403 deutlich zwischen beiden Zelllinien. Die als CEA-negativ beschriebenen Zelllinien SKOV-3, MSTO-211H und T-47D wurden nicht gefärbt. Der Antikörper SUW119-H2-Fc zeigte das gleiche spezifische Bindungsmuster, die CEA-Bindung war aber im Vergleich zu SUW59-A8-Fc mit 17,8 % bei LOVO-Zellen und 15,9 % bei SW-403-Zellen deutlich schwächer.



**Abbildung 5.5 Antigenbindung auf verschiedenen Tumorzelllinien**

Je 200.000 Zellen wurden mit 25 µg/ml scFv-Fc-Antikörper und einem FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper gefärbt. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen (bei T-47D 6.000 Zellen) analysiert. Als Referenz diente eine Isotypenkontrolle.

Für den Western Blot mit Immunfärbung wurden Lysate der Tumorzellen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen vorbereitet. Zusätzlich zu den in der Durchflusszytometrie verwendeten Zelllinien, wurden CEA-negative HeLa-Zellen (Cervixkarzinom; Blanco *et al.*, 2002) im Western Blot analysiert. Der Antikörper SUW59-A8-Fc band ausschließlich an das Antigen im Lysat der beiden CEA-exprimierenden Zelllinien LOVO und SW-403, unabhängig davon, ob das Lysat unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen vorbereitet wurde (siehe Abbildung 5.6). Damit bestätigten sich die Ergebnisse des Versuchs mit CEA-exprimierenden HEK293-6E-Zellen hinsichtlich der Bindung eines linearen Epitops durch den Antikörper.



**Abbildung 5.6 CEA-Nachweis auf verschiedenen Tumorzelllysaten**

Von sechs verschiedenen Tumorzelllinien wurden Lysate unter reduzierenden (A, + βMe; 95 °C) und nicht reduzierenden (B, - βMe; 56 °C) Bedingungen hergestellt. Die Zelllinien LOVO und SW-403 exprimieren das Antigen CEA. Je 10 µl der Lysate (entsprechend 100.000 Zellen) wurden anschließend auf ein 10 % iges SDS-PAA-Gel aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Immunfärbung mit jeweils 10 µg gereinigtem scFv-Fc-Antikörper pro Membran, einem AP-konjugiertem Ziege α-human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und dem Substrat NBT/BCIP.

Zusätzlich war bei beiden Tumorzelllinien eine Unschärfe der Bande zu beobachten, wie sie durch Glykosylierung des Antigens erzeugt werden kann. Die relative molekulare Masse von CEA und die Charakteristik der Bande unterschieden sich bei beiden Zelllinien, was auf eine unterschiedliche Glykosylierung des Antigens hindeutet.

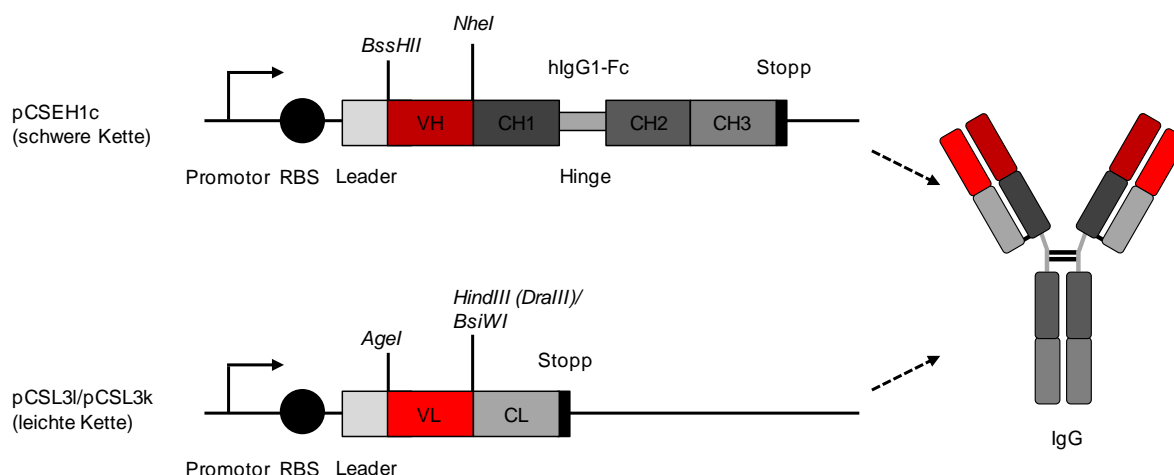
Der Antikörper SUW119-H2-Fc zeigte ebenfalls eine spezifische Bindung an CEA im Lysat der Zelllinien LOVO und SW-403 und wies keine unspezifische Bindung auf anderen Zelllinien auf. Der Nachweis war bei diesem Antikörper allerdings nur sehr schwach im nicht reduzierten Lysat möglich. Dieses Ergebnis unterscheidet sich vom Resultat des Western Blots auf CEA-transfizierten HEK293-6E-Zellen, bei dem das Antigen auch im reduzierten Lysat nachgewiesen werden konnte. Wie SUW59-A8-Fc ermöglichte auch der Antikörper SUW119-H2-Fc den Nachweis der unterschiedlich glykosylierten Varianten des Antigens bei beiden Zelllinien.

### **5.2.3 Affinitätsbestimmung der CEA-spezifischen Antikörper im scFv-Fc- und IgG-Format**

Um die Affinität der scFv-Fc-Antikörper zum Antigen CEA zu bestimmen, wurden Oberflächenplasmonresonanzmessungen (SPR) durchgeführt. Für die Messungen wurden die Antikörper als Ligand verwendet und über ihren Fc-Teil mittels *Human Capture Kit* auf einem CM5-Chip immobilisiert. Das Antigen CEA wurde in der monomeren Variante mit HIS-Tag als Analyt eingesetzt (aus vorherigen Versuchen vorliegend). Neben dem scFv-Fc-Format wurden die Antikörper auch im IgG-Format (human IgG1) vermessen. Die IgG-Varianten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Sonja Schauer kloniert und produziert (siehe Abbildung 5.7).

Die Affinität der Antikörper wurde unter Verwendung des *Drifting Baseline* Modells ermittelt, da das Antigen CEA-HIS (der Analyt) als Monomer verwendet wurde und eine 1:1 Bindung zwischen Ligand und Analyt vorlag. Die Affinitätsbestimmung war in diesem Versuchsaufbau jedoch nur für den Antikörper SUW59-A8 im scFv-Fc- und IgG-Format möglich. Es konnten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von  $K_D = 2,03 \times 10^{-8}$  M im scFv-Fc-Format und  $K_D = 4,31 \times 10^{-8}$  M im IgG-Format ermittelt werden (siehe Abbildung 5.8 und

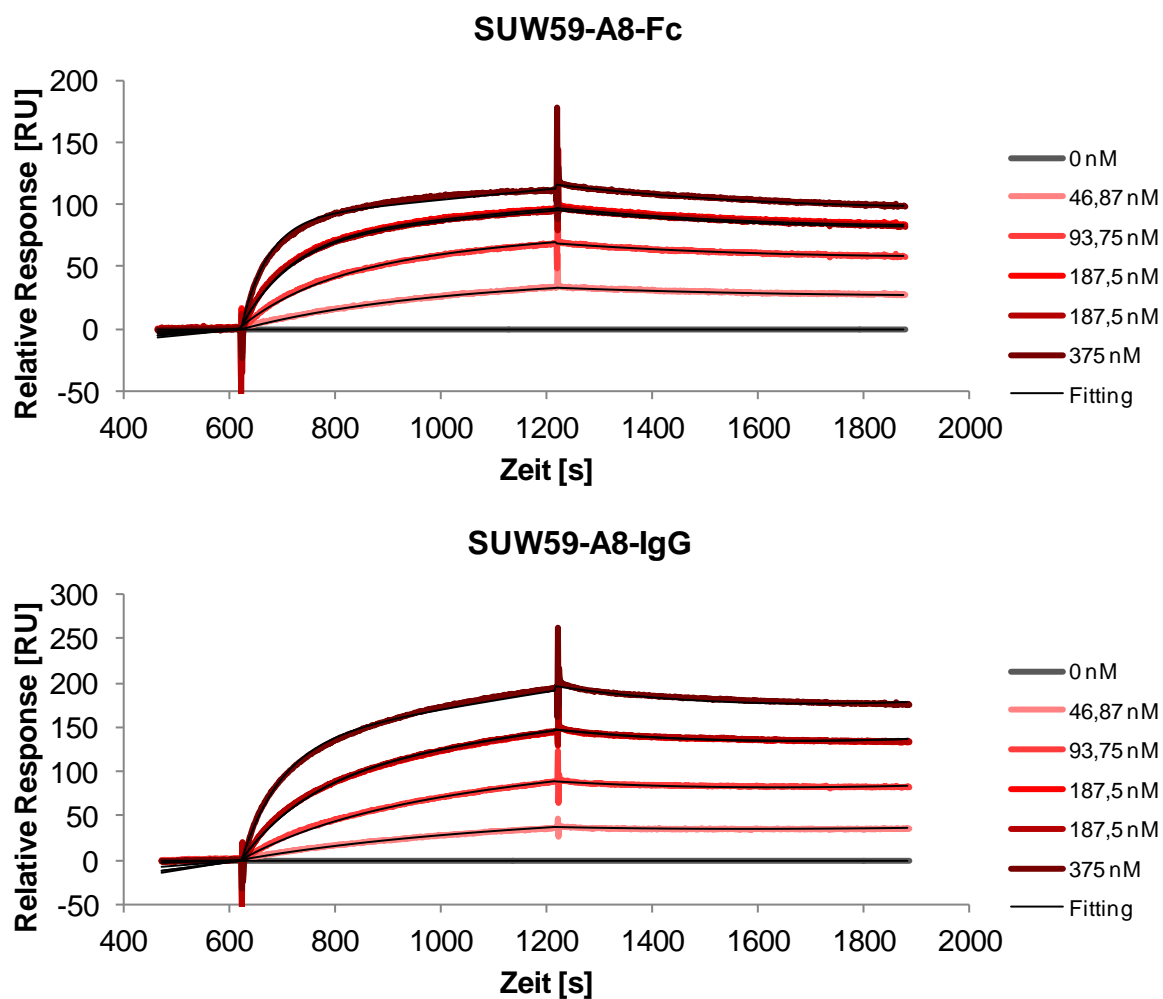
Tabelle 5.2). Folglich besitzt der Antikörper in beiden Formaten nahezu die gleiche Affinität und die Formatänderung führte zu keinem Verlust in der Bindungsstärke.



**Abbildung 5.7 Klonierungskassetten der Vektoren pCSEH1c, pCSL3l und pCSL3k**

Die eukaryotischen Expressionsvektoren pCSEH1c, pCSL3l und pCSL3k ermöglichen die Überführung und Expression von humanen Immunglobulinen (human IgG1) basierend auf Antikörpern im scFv-Format. Durch Restriktion mit den Enzymen *BssHII* und *NheI* kann die variable Domäne der schweren Kette (VH) eines scFv-Antikörpers in den Vektor pCSEH1c kloniert werden. Die Vektoren pCSL3l und pCSL3k dienen zur Klonierung und Expression der leichten Kette (Lambda und Kappa) des IgGs. Die Klonierung der variablen Domäne der leichten Kette (VL) erfolgt für Lambda über *AgeI* und *HindIII* (oder *DraIII*) und für Kappa über *AgeI* und *BsiWI*.

Für den Antikörper SUW119-H2 konnte in beiden Formaten keine Bindung gemessen werden. Daher wurde die Messung mit einem anderen Versuchsaufbau wiederholt. Das Antigen CEA-HIS wurde als Ligand an einen CM5-Chip gekoppelt und der Antikörper (der scFv-Fc- oder IgG-Antikörper) als Analyt verwendet. Da nun ein bivalenter Analyt verwendet wurde, wurde für die Auswertung das entsprechende Modell *Bivalent Analyte* herangezogen (siehe Tabelle 5.2 und Anhang Abbildung 8.3). In diesem Versuchsaufbau war die Bindung des Antikörpers SUW119-H2 im scFv-Fc- und IgG-Format an das Antigen CEA nachweisbar. Eine Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  war hingegen nicht möglich, da im bivalenten Modell zwei Assoziations- und Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Der Antikörper SUW59-A8 wurde zur Kontrolle ebenfalls im scFv-Fc- und IgG-Format in diesem Versuchsaufbau vermessen. Beide Antikörper wiesen in beiden Formaten ähnliche erste Assoziationskonstanten auf. Die erste Dissoziationskonstante lag bei SUW119-H2 in beiden Formaten eine Zehnerpotenz über der ersten Dissoziationskonstante der SUW59-A8-Antikörper, was auf eine schnellere Dissoziation des Antikörpers vom Antigen hinweist. Die zweite Assoziations- und Dissoziationskonstante unterschieden sich deutlich zwischen den beiden Antikörpern SUW59-A8 und SUW119-H2.



**Abbildung 5.8 SPR-Messung zur Affinitätsbestimmung von SUW59-A8-Fc und SUW59-A8-IgG**

Für die Analyse wurde ein muriner  $\alpha$  human IgG (Fc) Fängerantikörper an einen CM5-Chip gekoppelt. Vom jeweiligen Antikörper (Ligand) wurden anschließend 5  $\mu\text{g/ml}$  mit 10  $\mu\text{l/min}$  gecaptured. Die Vermessung des Analyts (CEA-HIS) erfolgte in Konzentrationen von 0 - 375 nM für 10 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{l/min}$ . Dargestellt sind die Sensogramme der Messungen.

**Tabelle 5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Affinitätsmessungen mittels SPR**

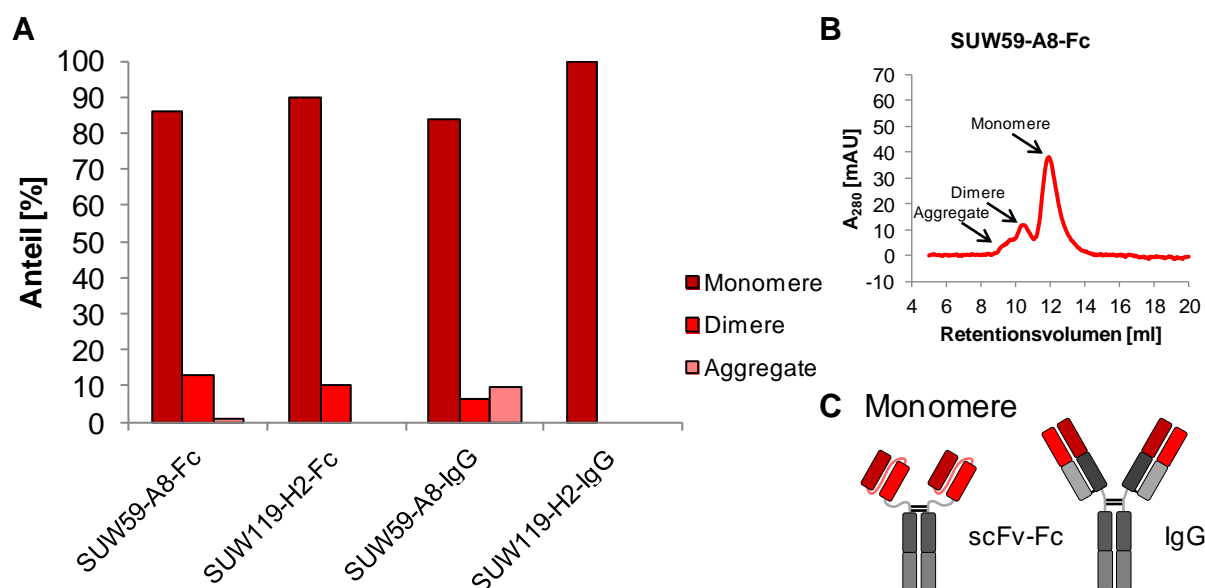
Bei der Analyse A wurden die Antikörper als Ligand eingesetzt und das Antigen CEA-HIS als Analyt über den Chip geleitet. Die Auswertung erfolgte mit dem Modell *Drifting Baseline*, da der Ligand über einen Fängerantikörper am Chip gecaptured wurde. Bei Analyse B wurde das Antigen CEA-HIS als Ligand gekoppelt und die Antikörper als Analyt verwendet. Zur Auswertung wurde das Modell *Bivalent Analyte* verwendet. Die Tabelle zeigt einen Überblick über die ermittelten Assoziations- und Dissoziationskonstanten ( $k_a$  und  $k_d$ ) sowie die Affinität in Form der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$ . Bei Analyse B ist aufgrund des Versuchsaufbaus und der Auswertung keine Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante möglich. Für den Antikörper SUW119-H2 konnte nur in diesem Modell eine Antigenbindung nachgewiesen werden.

Analyse	Antikörper	k <sub>a</sub> [1/Ms]	k <sub>d</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [M]	χ <sup>2</sup>	
A	SUW59-A8-Fc	4,97 x 10 <sup>4</sup>	1,01 x 10 <sup>-3</sup>	2,03 x 10 <sup>-8</sup>	0,67	
	SUW59-A8-IgG	3,10 x 10 <sup>4</sup>	1,34 x 10 <sup>-3</sup>	4,31 x 10 <sup>-8</sup>	1,39	
Analyse	Antikörper	k <sub>a1</sub> [1/Ms]	k <sub>d1</sub> [1/s]	k <sub>a2</sub> [1/RUs]	k <sub>d2</sub> [1/s]	χ <sup>2</sup>
B	SUW59-A8-Fc	4,58 x 10 <sup>4</sup>	1,09 x 10 <sup>-3</sup>	2,82 x 10 <sup>3</sup>	1,21 x 10 <sup>3</sup>	1,15
	SUW59-A8-IgG	8,72 x 10 <sup>4</sup>	1,53 x 10 <sup>-3</sup>	7,45 x 10 <sup>1</sup>	1,53 x 10 <sup>2</sup>	1,13
	SUW119-H2-Fc	2,77 x 10 <sup>4</sup>	2,12 x 10 <sup>-2</sup>	2,90 x 10 <sup>-5</sup>	6,10 x 10 <sup>-4</sup>	0,24
	SUW119-H2-IgG	5,95 x 10 <sup>4</sup>	2,35 x 10 <sup>-2</sup>	4,86 x 10 <sup>-5</sup>	2,53 x 10 <sup>-3</sup>	0,22

#### 5.2.4 Analyse des Aggregationsverhaltens der Antikörper

Die Aggregation von Antikörpern kann deren Bindungsverhalten negativ beeinflussen, weshalb eine möglichst geringe Tendenz zur Aggregatbildung von Vorteil ist. Insbesondere bei scFv-Fc-Antikörpern ist eine Neigung zur Bildung von Aggregaten aufgrund der Möglichkeit zur Bildung von intermolekularer Assoziation von VH und VL (analog zur Bildung von Diabodies) bekannt. Um das Aggregationsverhalten der Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 im scFv-Fc- und IgG-Format beurteilen zu können, wurde eine Größenausschlusschromatografie (SEC) durchgeführt. Zunächst wurde mit Proteinen bekannter Größe bzw. molekularer Masse eine Regressionsgerade erstellt. Nach der Vermessung der Antikörper konnte den erhaltenen Peaks mit Hilfe der Regressionsgerade eine Größe und somit auch die vorliegende Form (Monomer, Dimer, Aggregat) zugeordnet werden. Durch Berechnung der Flächen unter den Peaks wurde der jeweilige Anteil an Monomeren, Dimeren und Aggregaten in den Proben bestimmt (siehe Abbildung 5.9 und Anhang Abbildung 8.4).





**Abbildung 5.9 SEC zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens von SUW59-A8 und SUW119-H2**

Je 80 µg der aufgereinigten Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 wurden als scFv-Fc und IgG mit Hilfe einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule chromatografisch aufgetrennt. Anhand der erhaltenen Chromatogramme und einer Regressionsgeraden wurden anschließend die Größe der Proteine ermittelt. Durch Integration der Flächen unter den Peaks wurde der Anteil an Monomeren, Dimeren und Aggregaten in den Proben ermittelt. Diagramm A zeigt eine Zusammenfassung der ermittelten Werte. In Abbildung B ist beispielhaft ein Chromatogramm der Messungen dargestellt. Abbildung C zeigt die schematische Darstellung eines Monomers im scFv-Fc- und IgG-Format.

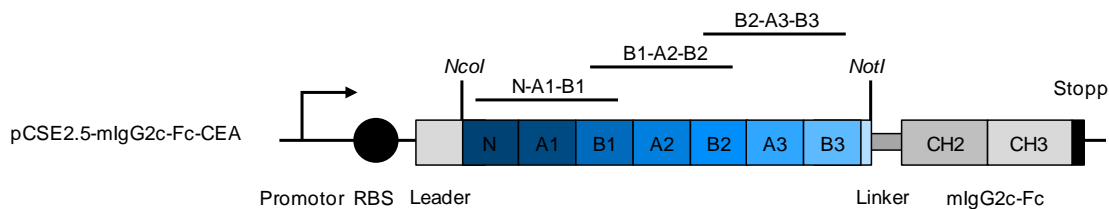
Der Antikörper SUW59-A8 lag in beiden Formaten zu über 80 % als Monomer vor (scFv-Fc: 86 % und IgG: 84 %). Im scFv-Fc-Format waren darüber hinaus ca. 13 % Dimere und 1% Aggregate vorhanden. Im IgG-Format verringerte sich der Anteil an Dimeren (6 %), der Anteil an Aggregaten stieg hingegen bis auf 10 %.

Der Antikörper SUW119-H2 lag im scFv-Fc-Format zu 90 % als Monomer und zu 10 % als Dimer vor. Als IgG zeigte dieser Antikörper keinerlei Aggregation und lag zu 100 % in monomerer Form vor.

### 5.2.5 Bestimmung der Antikörperbindungsgebiete im Antigen CEA

Als weiterer Schritt in der Charakterisierung der Antikörper wurden die Bereiche der Antigenbindung bestimmt. Das Antigen CEA besteht aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen und ist mittels GPI-Anker mit der Außenseite der Zellmembran verbunden. Um die Epitope, die von den Antikörpern SUW59-A8 und SUW119-H2 gebunden werden, genauer eingrenzen zu können, wurde das Antigen in drei Bereiche unterteilt und diese für die

eukaryotische Expression in den Vektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP kloniert (siehe Abbildung 5.10). Die klonierten Bereiche bestanden jeweils aus drei aneinander grenzenden Domänen, wobei die Konstrukte immer um eine Domäne überlappten.



**Abbildung 5.10 Schematische Darstellung der CEA-Konstrukte zur Bestimmung der Antikörperbindungsgebiete**

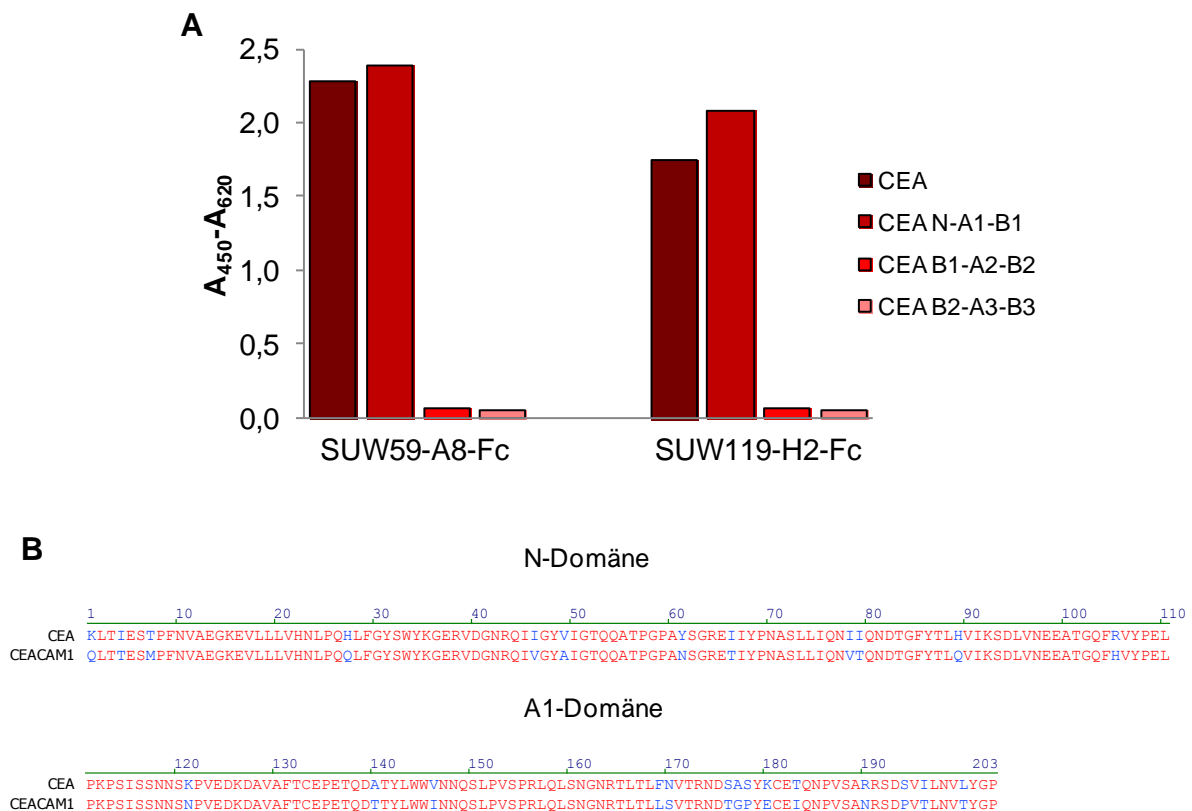
Das Antigen CEA lag bereits kloniert im Vektor pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP vor. Zusätzlich zu diesem Vektor wurden drei weitere CEA-Konstrukte in pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP erstellt. Hierzu wurden jeweils drei zusammenhängende Domänen des Antigens (Domänen/Konstrukt: N-A1-B1, B1-A2-B2 und B2-A3-B3) mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig die Schnittstellen für eine spätere Klonierung über die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* eingefügt. Die Sequenz der Konstrukte überlappt jeweils um eine Domäne. Die Konstrukte wurden anschließend für die transiente Transfektion von HEK293-6E-Zellen verwendet.

HEK293-6E Zellen wurden transient mit den Konstrukten transfiziert und die Proteine sekretorisch produziert. Durch die Verwendung des Vektors pCSE2.5-mIgG2c-Fc-XP wurden die Domänen als Fusionsproteine mit murinem IgG2c-Fc exprimiert. Die Reinigung der Proteine aus den Kulturüberständen erfolgte anschließend mittels Protein A-Affinitätschromatografie.

Die gereinigten Fusionsproteine sowie die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 (im scFv-Fc-Format) wurden für einen ELISA verwendet (siehe Abbildung 5.11). Beide Antikörper banden neben dem zur Kontrolle mitgeführten vollständigen Antigen, das Fusionsprotein aus den drei N-terminalen Domänen N, A1 und B1 und dem murinen IgG2c-Fc. Da keine Bindung an das Fusionsprotein mit den Domänen B1, A2 und A3 nachweisbar war, können die Epitope beider Antikörper auf die Domänen N und A1 eingegrenzt werden.

Die Sequenz der ermittelten Domänen von CEA wurde anschließend mit der Sequenz von CEACAM1 verglichen (siehe Abbildung 5.11). Beide Antigene weisen sehr starke Sequenzhomologien auf. CEACAM1 wurde zur Negativselektion der Phagenbibliothek im Panning verwendet, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die selektierten Antikörper das Antigen CEA in Bereichen mit nicht homologer Sequenz binden. Eine größere

Ansammlung unterschiedlicher Aminosäuren ist im C-terminalen Bereich der A1-Domäne zu finden. Daher ist die Lage der Epitope in diesem Bereich wahrscheinlich.



**Abbildung 5.11 Bestimmung der Antikörperbindungsbereiche im Antigen CEA**

A: ELISA; In den Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 ng Antigen immobilisiert. Als Antigene wurden Fusionsproteine aus CEA, CEA N-A1-B1 (bestehend aus den Domänen N, A1 und B1), CEA B1-A2-B2 (bestehend aus den Domänen B1, A2 und B2) sowie CEA B2-A3-B3 (bestehend aus den Domänen B2, A3, B3) und dem murinen IgG2c-Fc verwendet. Als Negativkontrolle wurde nur der murine IgG2c-Fc immobilisiert (nicht gezeigt). Anschließend wurden die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 als scFv-Fc-Fusionen in die Vertiefungen gegeben (je 1 µg/ml). Der Nachweis erfolgte über einen HRP-konjugierten Ziege α-human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und das Substrat TMB.

B: Alignment der N- und A1-Domänen von CEA und CEACAM1; Unterschiede in beiden Aminosäuresequenzen sind in blau dargestellt.

## 5.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung CEA-spezifischer Antikörper

Tabelle 5.3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Charakterisierung der CEA-spezifischen Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2.

**Tabelle 5.3 Übersicht über die Ergebnisse der Charakterisierung CEA-spezifischer Antikörper**

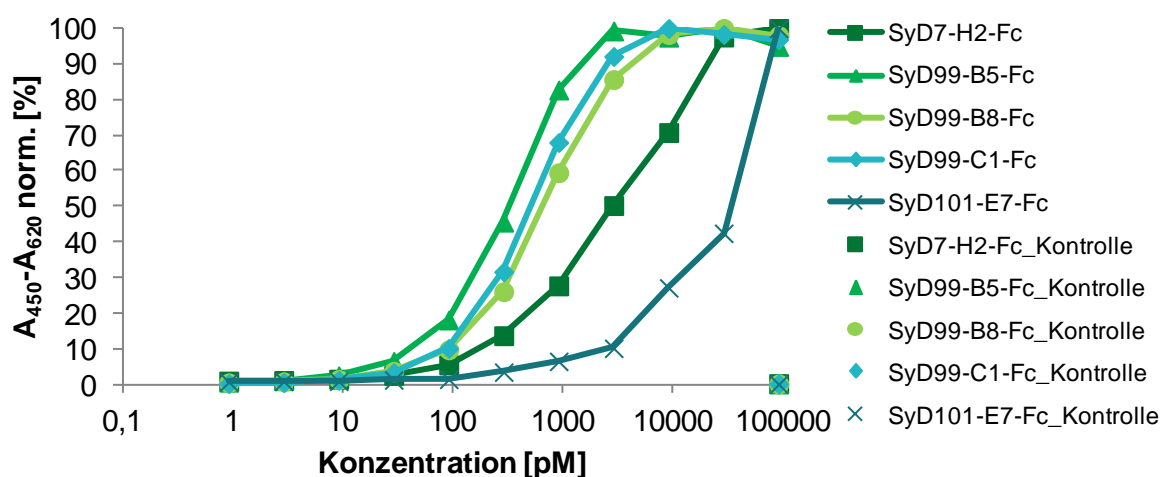
Die Antikörper wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, im scFv-Fc charakterisiert. Einzelne Experimente wurden auch im IgG-Format durchgeführt. Titrations-ELISA: - keine Bindung, + Bindung; Western Blot mit Immunfärbung: - keine Bindung, + Bindung; Durchflusszytometrie: - keine Bindung, + schwache Bindung, ++ mittlere Bindung, +++ starke Bindung; WB: Western Blot mit Immunfärbung, red.: reduzierende Bedingungen, n. red.: nicht reduzierende Bedingungen

		Antikörper (scFv-Fc)	
		SUW59-A8-Fc	SUW119-H2-Fc
Antigen		CEA	CEA
<b>Titrationen-ELISA</b>		+	+
<b>HEK293-6E</b>	Durchflusszytometrie	++	++
<b>transfiziert mit CEA</b>	WB (red./n. red.)	+ (red./n. red.)	+ (red./n. red.)
<b>HEK293-6E</b>	Durchflusszytometrie	-	-
<b>nicht transfiziert</b>	WB (red./n. red.)	- (red./n. red.)	- (red./n. red.)
<b>Tumorzelllinien</b>	LOVO	++	+
	SW-403	++	+
	MCF-7	++	+
	SKOV-3	-	-
	MSTO-211H	-	-
	T-47D	-	-
<b>Durchflusszytometrie</b>	LOVO	+ (red./n. red.)	+ (n. red.)
	SW-403	+ (red./n. red.)	+ (n. red.)
	SKOV-3	-	-
	MSTO-211H	-	-
	T-47D	-	-
	HeLa	-	-
<b>Affinität (SPR)</b>		2,03 x 10 <sup>-8</sup>	-
		4,31 x 10 <sup>-8</sup> (IgG)	-
<b>Aggregation (SEC)</b>	Monomere	86 %	90 %
		84 % (IgG)	100 % (IgG)
	Dimere	13 %	10 %
		6 % (IgG)	0 % (IgG)
	Aggregate	1 %	0 %
		10 % (IgG)	0 % (IgG)

### 5.3 Charakterisierung NKG2D-spezifischer Antikörper im scFv-Fc-Format

In dieser Arbeit sollen bispezifische Antikörper generiert werden, die ein Tumor- und ein Effektorantigen binden. Bei Effektorantigenen handelt es sich um Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen, wie T- oder NK-Zellen. Als Effektorantigen wurde in dieser Arbeit der aktivierende NK-Zellrezeptor NKG2D gewählt. Nach der Charakterisierung der tumorspezifischen Antikörper, wurden nun die Effektorantigen-spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 5.1) umfassend analysiert. Die bereits vorhandenen NKG2D-spezifischen Antikörper wurden für die Charakterisierung aus dem scFv-Format in das scFv-Fc-Format überführt. Klonierung und Produktion erfolgten analog zu den CEA-spezifischen Antikörpern mit Hilfe des Vektors pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP und der Zelllinie HEK293-6E.

Im ersten Test wurden die scFv-Fc-Antikörper auf ihre Antigenbindung überprüft. Dazu wurde ein Titrations-ELISA auf dem Antigen NKG2D durchgeführt (siehe Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.12** Titrations-ELISA mit auf NKG2D selektierten scFv-Fc-Antikörpern

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 100 ng Antigen (NKG2D-HIS) oder BSA (Negativkontrolle) beschichtet. Anschließend wurden die scFv-Fc-Antikörper in der Platte titriert. Der Nachweis erfolgte über einen HRP-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und das Substrat TMB.

Das Antigen wurde im Vorfeld als Fusionsprotein mit murinem IgG2c-Fc oder mit HIS-Tag sekretorisch in HEK293-6E-Zellen produziert und affinitätschromatografisch gereinigt. (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrollen wurden der murine IgG2c-Fc und BSA im

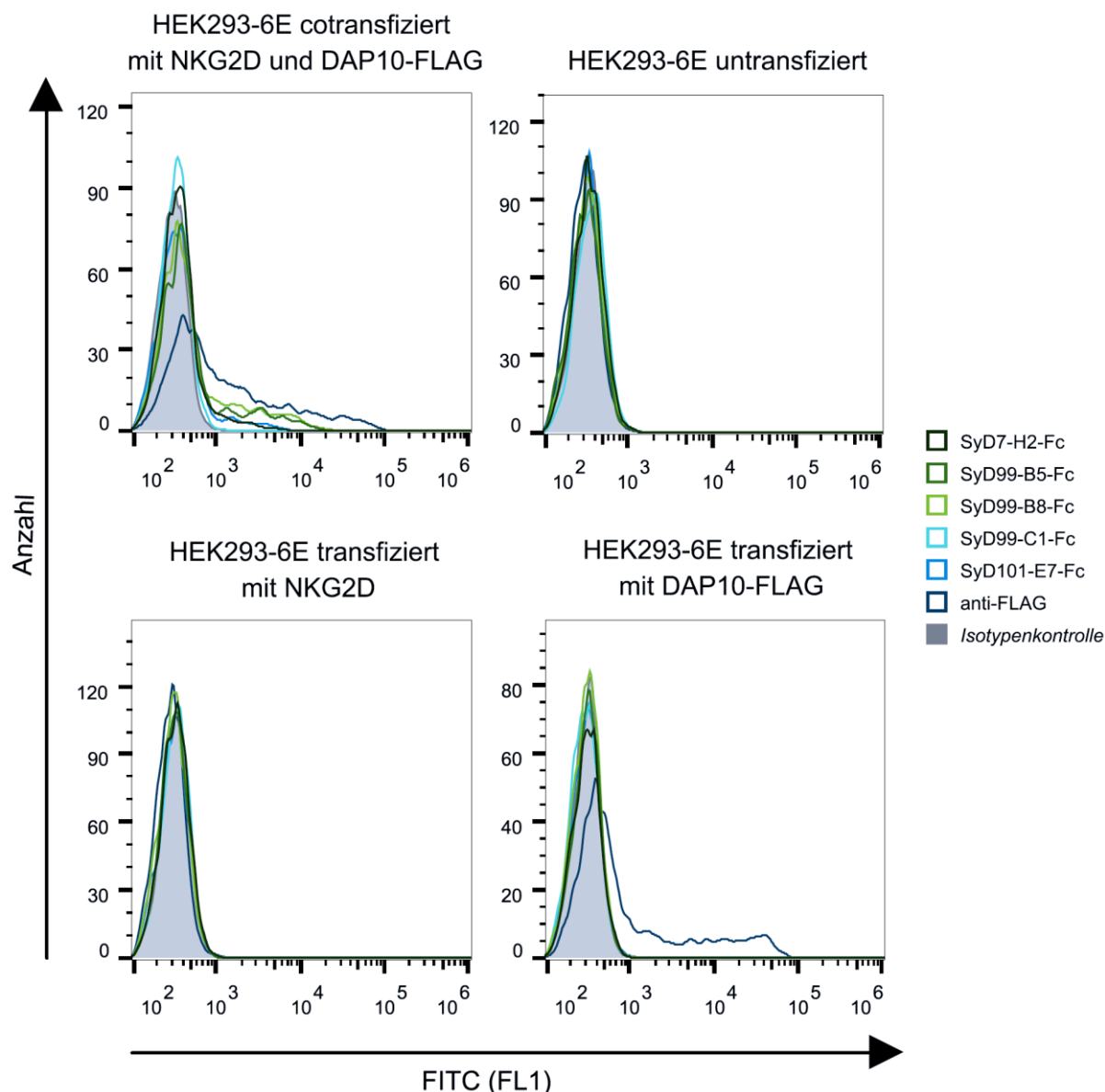
ELISA verwendet. Alle getesteten Antikörper banden an das Antigen NKG2D, wobei auf beiden Antigenvarianten vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Die Antikörper SyD99-B5-Fc, SyD99-B8-Fc und SyD99-C1-Fc wiesen schon bei geringen Konzentrationen eine deutliche Antigenbindung auf. Im Vergleich dazu banden die Antikörper SyD7-H2-Fc und SyD101-E7-Fc deutlich schwächer an NKG2D.

### 5.3.1 Spezifische Antigenbindung auf HEK293-6E-Zellen

Im Anschluss an den Titrations-ELISA wurde die Antigenbindung der scFv-Fc-Antikörper auf HEK293-6E-Zellen untersucht. Die Zelllinie wurde hierfür untransfiziert verwendet, oder mit NKG2D und DAP10 cotransfiziert. Beide Proteine wurden für die Expression in den Vektor pCSE2.5-XP kloniert. Das Adapterprotein DAP10 wurde zusätzlich mit einem C-terminalen FLAG-Tag versehen, um die Expression über einen Tag-spezifischen Antikörper überprüfen zu können. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse und einen Western Blot mit Immunfärbung verwendet.

In der durchflusszytometrischen Analyse konnte für vier der fünf getesteten scFv-Fc-Antikörper (SyD7-H2-Fc, SyD99-B5-Fc, SyD99-B8-Fc und SyD101-E7-Fc) eine Bindung an NKG2D/DAP10-FLAG-cotransfizierte Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.13). Keiner der getesteten Antikörper band auf untransfizierten Zellen oder Zellen, die nur mit NKG2D oder DAP10-FLAG transfiziert wurden. Mit Hilfe eines FLAG-spezifischen Antikörpers konnte die DAP10-Expression bei NKG2D/DAP10-FLAG-cotransfizierten Zellen und DAP10-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.13).

Für die Durchführung des Western Blots wurden von den NKG2D/DAP10-cotransfizierten und untransfizierten HEK293-6E-Zellen Zelllysate hergestellt. Durch Verwendung reduzierender oder nicht reduzierender Bedingungen bei der Lysatherstellung, sollte damit neben der Spezifität der Antikörper auch die Art des Epitops (linear oder konformationell) bestimmt werden. Nach dem Western Blot erfolgte die Immunfärbung mit den NKG2D-spezifischen scFv-Fc-Antikörpern. Bei keinem der fünf Antikörper konnte eine spezifische oder unspezifische Bindung nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 8.5). Dies deutet auf die Bindung konformationeller Epitope, die durch die denaturierende Vorbehandlung der Zelllysate nicht erhalten bleiben.



**Abbildung 5.13** Durchflusszytometrische Analyse auf HEK293-6E-Zellen

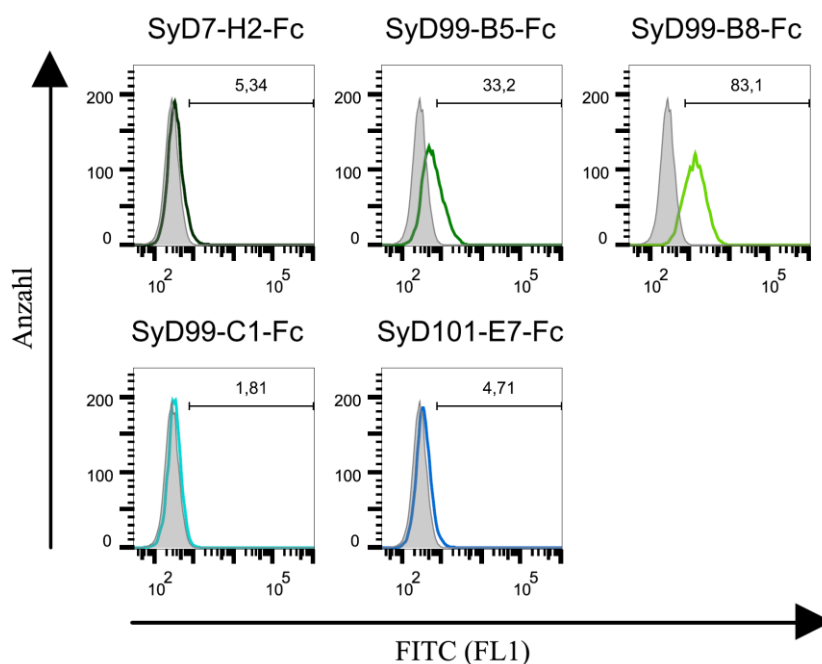
HEK293-6E-Zellen wurden transient mit den Antigenen NKG2D und DAP10-FLAG cotransfiziert. Parallel wurden Einzeltransfektionen mit NKG2D oder DAP10-FLAG durchgeführt. 48 h nach den Transfektionen bzw. untransfiziert wurden die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse eingesetzt. Je 200.000 Zellen wurden mit 5 µg/ml scFv-Fc und einem FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper gefärbt. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 8.000 Zellen analysiert. Als Referenz diente eine Isotypenkontrolle.

### 5.3.2 Analyse der Antgenspezifität auf der Zelllinie NK-92

Die Bindung der scFv-Fc-Antikörper an endogen exprimiertes NKG2D wurde mit Hilfe der Zelllinie NK-92 untersucht. Bei NK-92 handelt es sich um eine Zelllinie, die 1992 aus einem Non-Hodgkin-Lymphom etabliert wurde (Gong *et al*, 1994). Phänotypische, genetische und

funktionelle Analysen charakterisierten sie als NK-Zelllinie. Das Wachstum der Zellen ist IL-2 abhängig. Sie weisen eine hohe zytotoxische Aktivität auf und exprimieren eine Vielzahl aktivierender Rezeptoren, u. a. auch NKG2D. Ein weiteres Charakteristikum der Zellen ist das Fehlen des Fc-Rezeptors FcγRIIIa (CD16a), wodurch keine ADCC ausgelöst werden kann. (Gong *et al*, 1994; Maki *et al*, 2001). Diese Eigenschaften ermöglichen die spezifische Analyse der NKG2D-Bindung der zu testenden Antikörper, ohne das Risiko der Interferenz durch Bindung des vorhandenen Fc-Teils. Die spezifische Antigenbindung wurde mittels Durchflusszytometrie und Western Blot mit Immunfärbung untersucht.

Zwei der fünf getesteten scFv-Fc-Antikörper wiesen in der Durchflusszytometrie mit 33,2 % (SyD99-B5-Fc) und 83,1 % (SyD99-B8-Fc) gefärbten Zellen eine signifikante Bindung auf der Oberfläche der NK-92 Zellen auf (siehe Abbildung 5.14). Bei den Antikörpern SyD7-H2-Fc, SyD99-C1-Fc und SyD101-E7-Fc wurde nur eine sehr schwache Anfärbung der NK-92 Zellen bis maximal 5 % der Zellen erreicht.



**Abbildung 5.14 Durchflusszytometrie von anti NKG2D scFv-Fc Antikörpern auf NK-92-Zellen**

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden je 200.000 Zellen der Zelllinie NK-92 mit 5 µg/ml NKG2D-spezifischen scFv-Fc-Antikörpern und einem FITC-konjugierten Ziege α-human Fc (γ-spezifisch) Sekundärantikörper gefärbt. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen analysiert. Als Referenz diente eine Isotypenkontrolle.

Für den Western Blot mit Immunfärbung wurden von den NK-92-Zellen Lysate hergestellt, die reduzierend und nicht reduzierend vorbehandelt wurden. Übereinstimmend mit den

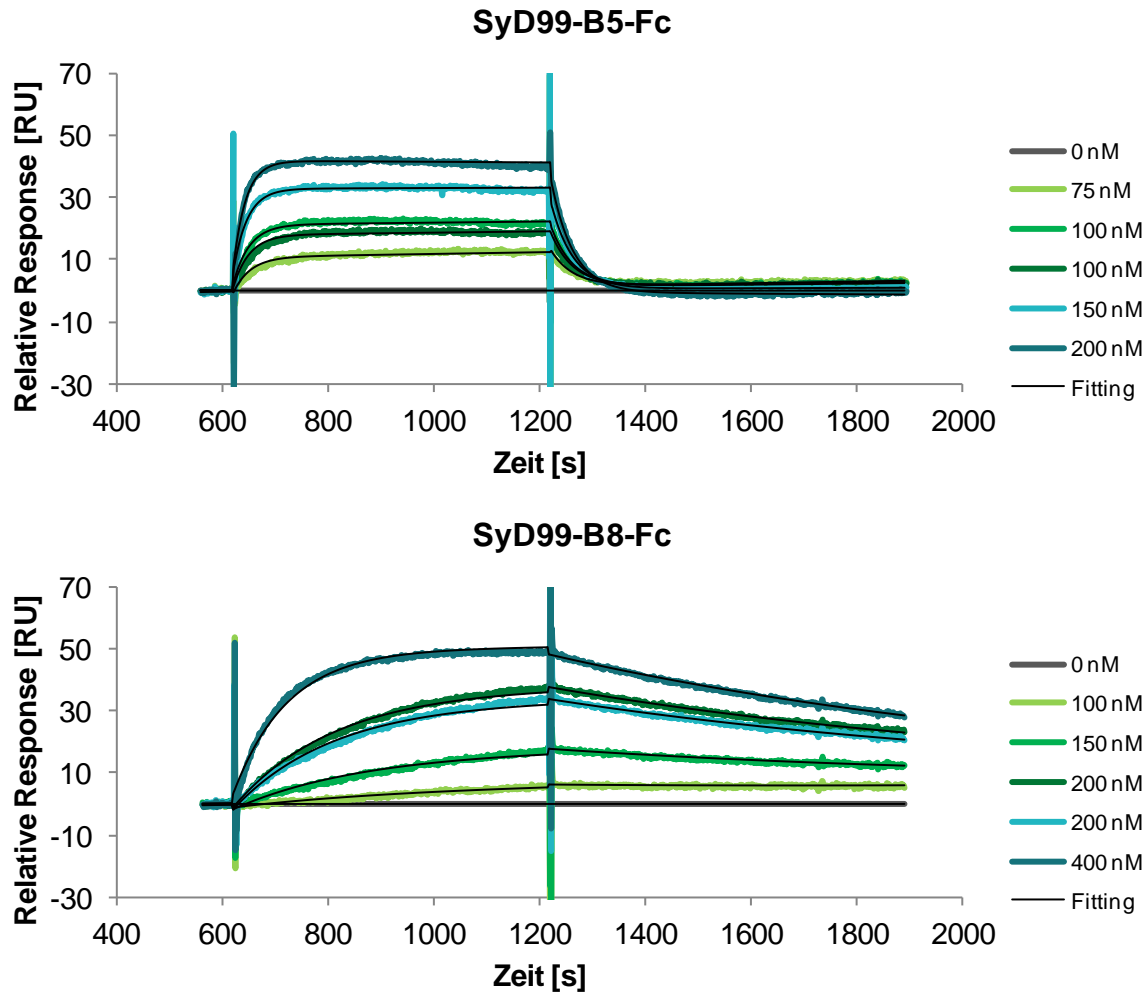


bisherigen Ergebnissen (siehe Abschnitt 5.3.1) konnte bei beiden Lysaten keine Bindung im erwarteten Bereich entsprechend einer relativen molekularen Masse von NKG2D von ca. 20 kDa durch die Antikörper nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 8.6). Vier der fünf Antikörper (SyD7-H2-Fc, SyD99-B5-Fc, SyD99-B8-Fc und SyD101-E7-Fc) zeigten keine unspezifischen Reaktionen. Der Antikörper SyD99-C1-Fc wies hingegen im reduzierend und nicht reduzierend behandelten Lysat eine deutliche Bindung an eine Bande bei ca. 75 kDa auf.

### 5.3.3 Affinitätsbestimmung von SyD99-B5 und SyD99-B8

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurden die Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 für die weitere Charakterisierung ausgewählt. In den bisherigen Versuchen wiesen diese Antikörper durchweg eine spezifische Antigenbindung auf und führten zu den stärksten Signalen.

Im nächsten Schritt wurde die Affinität dieser scFv-Fc-Antikörper mittels SPR ermittelt. Die Antikörper wurden über ihren Fc-Teil als Ligand mittels *Human Capture Kits* auf einem CM5-Chip immobilisiert. Anschließend wurde das Antigen NKG2D als HIS-getaggte Variante über den Chip geleitet (Analyt; siehe Abbildung 5.15). Da ein monomerer Analyt verwendet wurde, lag eine 1:1 Interaktion zwischen Ligand und Analyt vor. Für die Auswertung wurde das Modell *Drifting Baseline* verwendet. Für beide Antikörper konnten im scFv-Fc-Format so Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von  $K_D = 2,57 \times 10^{-7}$  M (SyD99-B5-Fc) und  $K_D = 3,98 \times 10^{-8}$  M (SyD99-B8-Fc) ermittelt werden (siehe Tabelle 5.4). Der Antikörper SyD99-B8-Fc wies somit eine höhere Affinität zu Antigen NKG2D auf als der Antikörper SyD99-B5-Fc.



**Abbildung 5.15 Affinitätsbestimmung von SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc**

Zur Bestimmung der Affinität beider Antikörper wurden SPR-Messungen durchgeführt. Ein muriner  $\alpha$  human IgG (Fc) Fängerantikörper wurde zunächst an einen CM5-Chip gekoppelt. Anschließend wurden 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vom jeweiligen Antikörper (Ligand) mit 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  gecaptured. Der Analyt NKG2D-HIS wurde für 10 min in Konzentrationen von 75 - 400 nM und einer Fließgeschwindigkeit von 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  vermessen. Dargestellt sind die Sensorgramme der Messungen.

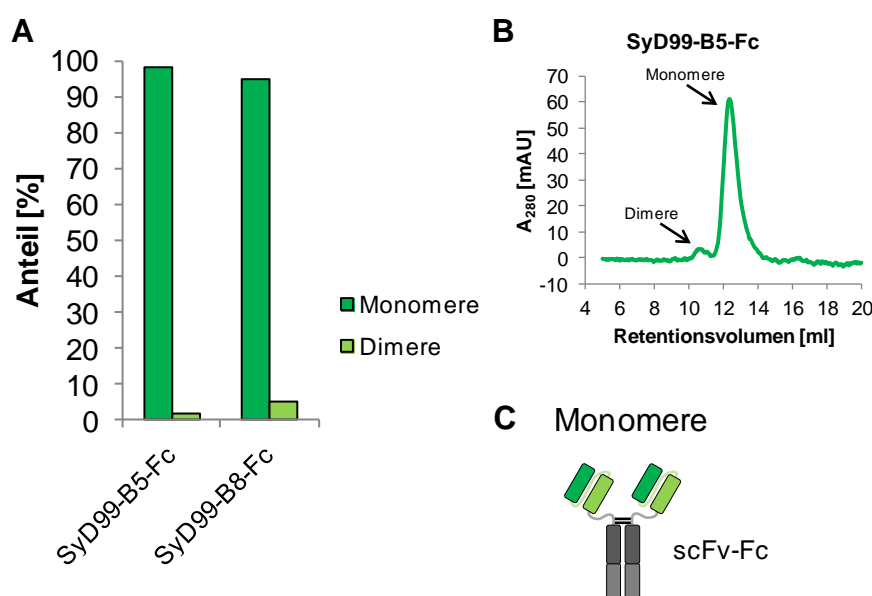
**Tabelle 5.4 Ergebnisse der Affinitätsbestimmung der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc**

Bei den durchgeführten SPR-Messungen wurden die Antikörper als Liganden und das Antigen NKG2D-HIS als Analyt verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Modell *Drifting Baseline*. Die Tabelle zeigt einen Überblick über die ermittelten Assoziations- und Dissoziationskonstanten ( $k_a$  und  $k_d$ ) sowie die Affinität in Form der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$ .

Antikörper	$k_a$ [1/Ms]	$k_d$ [1/s]	$K_D$ [M]	$\chi^2$
SyD99-B5-Fc	$9,27 \times 10^4$	$2,38 \times 10^{-2}$	$2,57 \times 10^{-7}$	0,26
SyD99-B8-Fc	$2,22 \times 10^4$	$8,85 \times 10^{-4}$	$3,98 \times 10^{-8}$	0,35

### 5.3.4 Aggregationsverhalten NKG2D-spezifischer Antikörper im scFv-Fc-Format

Das Aggregationsverhalten der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc wurde mittels SEC untersucht. Anhand einer Regressionsgeraden wurden den erhaltenen Peaks eine Größe zugeordnet. Der Anteil an Monomeren, Dimeren und Aggregaten wurde anschließend durch Berechnung der Flächen unter den Peaks ermittelt. Beide Antikörper zeigten mit einem Monomeranteil von über 95 % (98 % bei SyD99-B5-Fc und 95 % bei SyD99-B8-Fc) eine sehr geringe Aggregationstendenz und bildeten neben den Monomeren ausschließlich einen geringen Anteil an Dimeren (siehe Abbildung 5.16). Größere Aggregate konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.16 SEC-Analyse der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc**

Von beiden scFv-Fc-Antikörpern wurden je 80 µg auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule chromatografisch aufgetrennt. Anhand der Peaks in den Chromatogrammen und einer Regressionsgeraden wurde die Größe der Proteine bestimmt. Durch Integration der Flächen unter den Peaks wurde der Anteil an Monomeren und Dimeren in den Proben ermittelt (A). Abbildung B zeigt beispielhaft ein Chromatogramm einer Messung. In Abbildung C ist ein monomerer scFv-Fc-Antikörper schematisch dargestellt.

### 5.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung NKG2D-spezifischer Antikörper

Tabelle 5.5 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse der Charakterisierung der NKG2D-spezifischen Antikörper. Anhand der Ergebnisse wurden die Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 für die weiteren Versuche ausgewählt.

**Tabelle 5.5 Übersicht über die Ergebnisse der Charakterisierung NKG2D-spezifischer Antikörper**

Die Antikörper wurden im scFv-Fc-Format charakterisiert. Titrations-ELISA: - keine Bindung, + Bindung; Western Blot mit Immunfärbung: - keine Bindung, + Bindung; Durchflusszytometrie: - keine Bindung, + schwache Bindung, ++ mittlere Bindung, +++ starke Bindung; WB: Western Blot mit Immunfärbung, red.: reduzierende Bedingungen, n. red.: nicht reduzierende Bedingungen, n.d.: nicht durchgeführt

Antigen		Antikörper (scFv-Fc)				
		SyD7-H2-NKG2D	SyD99-NKG2D	SyD99-NKG2D	SyD99-NKG2D	SyD101-NKG2D
<b>Titrationen-ELISA</b>		+	+	+	+	+
<b>HEK293-6E</b> transfiziert mit <b>NKG2D/DAP10</b>	Durchflusszytometrie	+	+	+	-	+
	WB (red./n. red.)	-	-	-	-	-
<b>HEK293-6E</b> nicht transfiziert	Durchflusszytometrie	-	-	-	-	-
	WB (red./n. red.)	-	-	-	-	-
<b>Tumorzelllinie</b> <b>NK-92</b>	Durchflusszytometrie	-	++	++	-	-
	WB (red./n. red.)	- (red./n. red.)	- (red./n. red.)	- (red./n. red.)	- (unspez.)	- (red./n. red.)
<b>Affinität (SPR)</b>		n.d.	$2,57 \times 10^{-7}$	$3,98 \times 10^{-8}$	n.d.	n.d.
<b>Aggregation</b> (SEC)	Monomere	n.d.	98 %	95 %	n.d.	n.d.
	Dimere	n.d.	2 %	5 %	n.d.	n.d.
	Aggregate	n.d.	0 %	0 %	n.d.	n.d.

## 5.4 Bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format

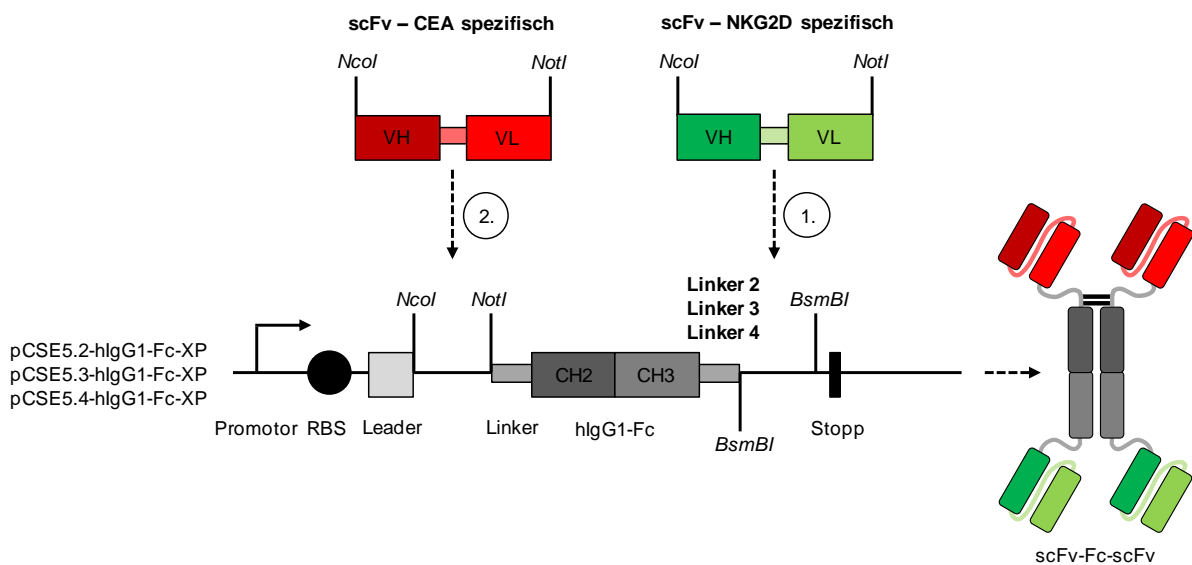
### 5.4.1 Konstruktion bispezifischer Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format

Nach der Charakterisierung der Antikörper im scFv-Fc-Format sollten diese in ein bispezifisches Format überführt werden. Hierzu wurde das scFv-Fc-scFv-Format gewählt. Es ermöglicht die direkte Klonierung der scFvs über die bereits vorhandenen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* in ein bispezifisches Format. Der Fc-Teil zwischen den scFv-Antikörpern führt bei der Produktion zur Dimerisierung zweier Ketten, wodurch bivalente Proteine gebildet werden. Da die Antikörper nur aus gleichen Ketten aufgebaut werden können, wird die Bildung von monospezifischen homodimeren Varianten ausgeschlossen. Für die Klonierung wurden die bereits vorhandenen Vektoren pCSE5.2-hIgG1-Fc-XP, pCSE5.3-hIgG1-Fc-XP und pCSE5.4-hIgG1-Fc-XP verwendet. Die Vektoren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Sylvia Dietrich erstellt. Die drei Vektoren besitzen den gleichen Grundaufbau, unterscheiden sich jedoch im Linker, der zur C-terminalen Fusion des scFv-Antikörpers an den Fc-Teil genutzt wird. Der Vektor pCSE5.2-hIgG1-Fc-XP enthält einen artifiziellen 8 Aminosäuren langen GS-Linker (Linker 2). Im Vektor pCSE5.3-hIgG1-Fc-XP wurde ein 18 Aminosäuren langer Linker verwendet, der auf der extrazellulären Membran-proximalen Domäne (EMPD) eines IgG-basierten B-Zell-Rezeptores beruht (Linker 3). Über das in der Sequenz enthaltene Cystein kann eine Disulfidbrücke im bivalenten Antikörper ausgebildet werden. Der Vektor pCSE5.4-hIgG1-Fc-XP enthält eine 13 Aminosäuren lange Linkersequenz, die von der EMPD-Domäne eines IgM-B-Zell-Rezeptors abgeleitet wurde (Linker 4).

Bei der Klonierung wurde zunächst die DNA für den C-terminal vom Fc-Teil positionierten scFv-Antikörper in die drei Vektoren eingesetzt. Die DNA für das scFv-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* aus dem Ausgangsvektor geschnitten. Die Zielvektoren wurden mit dem Enzym *BsmBI* geschnitten. Die so entstandenen Überhänge waren zueinander kompatibel, was die direkte Klonierung des scFv-Fragments in die Vektoren ermöglichte. Bei der Ligation der Fragmente wurden die Erkennungsmotive der Enzyme zerstört, wodurch das scFv-Fragment nicht wieder über diese Schnittstellen entfernt werden kann. Dies erlaubte im zweiten Schritt der Klonierung das Einfügen des Gens für das

N-terminal gelegene scFv-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* (siehe Abbildung 5.17).

Bei sämtlichen Konstrukten wurden die Gene für die NKG2D-spezifischen scFv-Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 3' vom Fc-Teil kloniert. Der Tumorantigen-spezifischen Antikörper SUW59-A8 wurde wie bisher 5' vom Fc-Teil kloniert. Durch diese Festlegung wurde zum einen die Anzahl an möglichen Konstrukten reduziert. Zum anderen wurde davon ausgegangen, dass - im Hinblick auf die Funktion der Antikörper - eine starke Tumorbinding und möglicherweise positionsbedingt eine schwächere Effektorbindung von Vorteil sind.

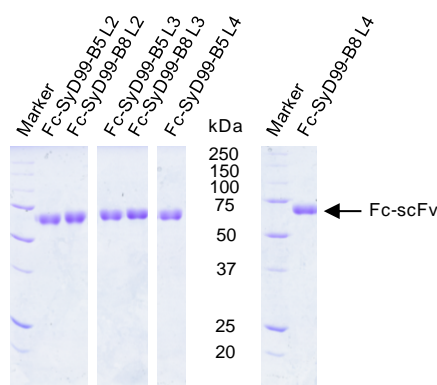


**Abbildung 5.17 Klonierungsstrategie zur Generierung bispezifischer Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format**

Zur Generierung bispezifischer Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format wurde im ersten Schritt der C-terminal vom Fc-Teil gelegene scFv-Antikörper kloniert ①. Dafür wurde das scFv-Fragment mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* aus dem Ausgangsvektor pCSE2.5-hIgG1-Fc geschnitten. Die Zielvektoren pCSE5.2-hIgG1-Fc-XP, pCSE5.3-hIgG1-Fc-XP und pCSE5.4-hIgG1-Fc-XP wurden mit dem Enzym *BsmBI* geschnitten, um *NcoI/NotI*-kompatible Enden zu erhalten. Bei der anschließenden Ligation von Vektor und scFv-Antikörper wurden die Erkennungssequenzen der Enzyme beseitigt. Zur Klonierung des N-terminalen scFv-Fragments wurden die Ausgangs- und Zielvektoren mit *NcoI* und *NotI* geschnitten ②. Die Schnittstellen der Enzyme blieben bei der anschließenden Ligation erhalten. Die drei verwendeten Zielvektoren unterscheiden sich hinsichtlich des Linkers, der zur Fusion des C-terminalen scFv-Fragments genutzt wurde.

### 5.4.2 Charakterisierung von Fc-scFv-Antikörpern

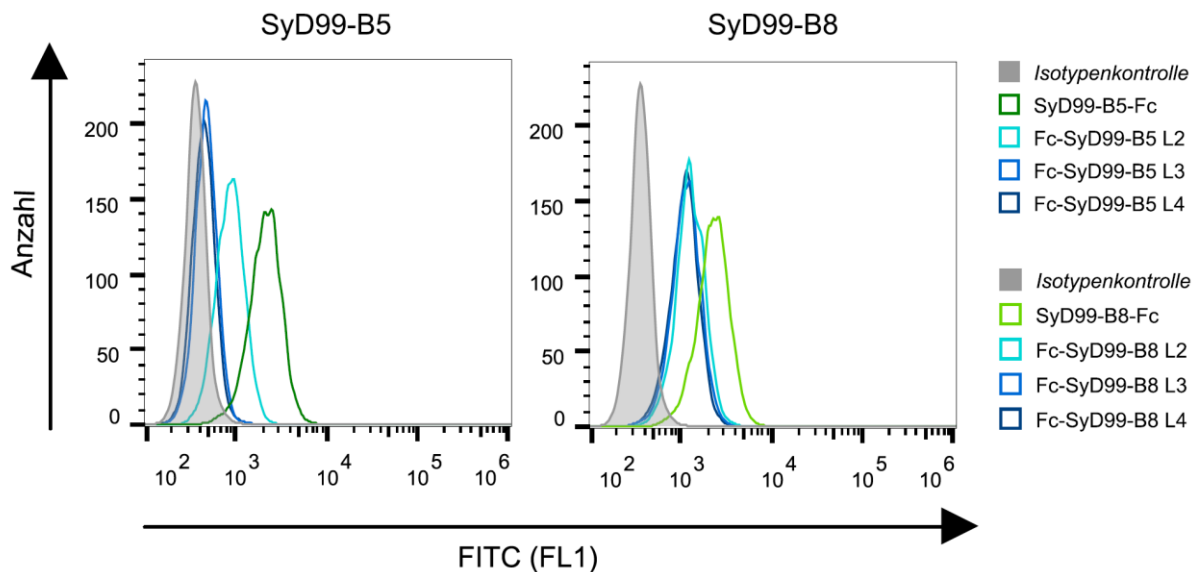
Vor der Klonierung der vollständigen bispezifischen Antikörper sollte die Zwischenstufe aus Fc-Teil und C-terminalem scFv-Fragment hinsichtlich der Antigenbindung und des Aggregationsverhaltens überprüft werden. Dazu wurden die Konstrukte in HEK293-6E-Zellen sekretorisch produziert und mittels Protein A-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Der Erfolg von Produktion und Reinigung wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung überprüft (siehe Abbildung 5.18). Danach erfolgten eine durchflusszytometrische Analyse auf NKG2D-exprimierenden NK-92-Zellen und eine SEC.



**Abbildung 5.18 SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung zur Kontrolle der Produktion und Reinigung von Fc-scFv-Antikörpern**

Die Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 wurden je mit drei unterschiedlichen Linkervarianten (L2, L3, L4) als Fc-scFv-Antikörper sekretorisch in HEK293-6E-Zellen produziert und anschließend affinitätschromatografisch gereinigt. Zur Kontrolle der Produktion und Reinigung wurde je 1 µg der Antikörper auf ein 12 % iges SDS-PAA-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE erfolgte zum Nachweis der Proteine eine Coomassie-Färbung der Gele.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die spezifische Antigenbindung der Antikörper überprüft. Die NK-92-Zellen konnten mit sämtlichen Antikörpern gefärbt werden, jedoch unterschied sich die Intensität der Fluoreszenz deutlich zwischen den einzelnen Konstrukten (siehe Abbildung 5.19).



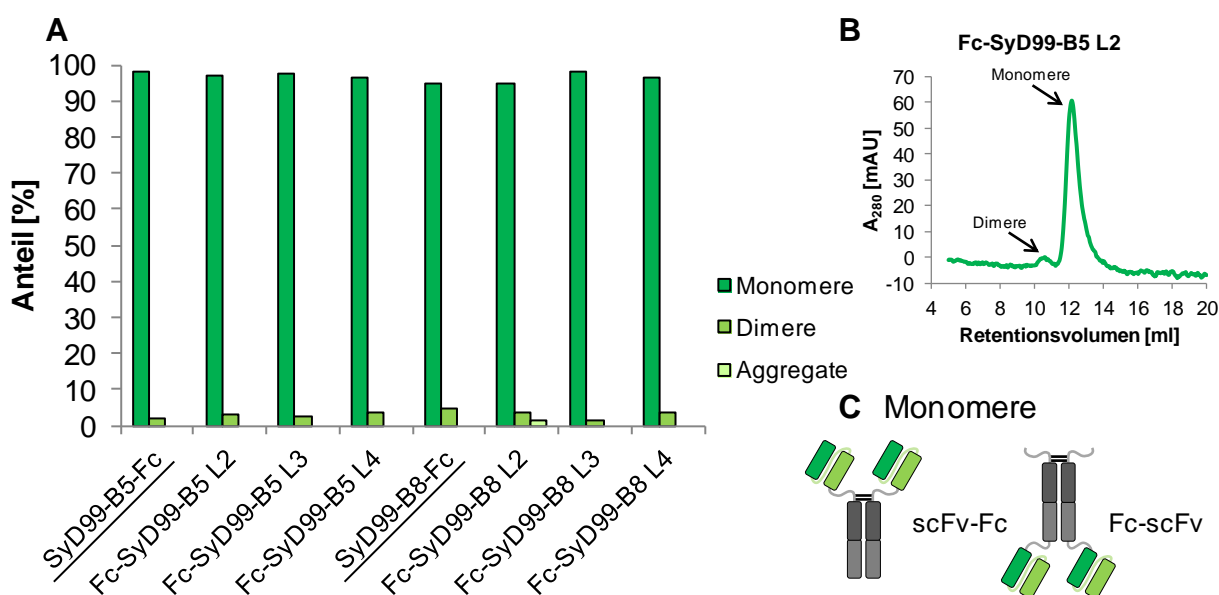
**Abbildung 5.19 Durchflusszytometrische Analyse von scFv-Fc- und Fc-scFv-Antikörpern auf NK-92-Zellen**

Je 200.000 NK-92-Zellen wurden mit 25 µg/ml NKG2D-spezifischen scFv-Fc- und Fc-scFv-Antikörpern gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen analysiert. Als Referenz diente eine Isotypenkontrolle.

Sowohl bei SyD99-B5 als auch bei SyD99-B8 führte eine C-terminale Fusion des scFv-Fragments an den Fc-Teil (Fc-scFv) zu einer geringeren Fluoreszenzintensität, bedingt durch eine schwächere NKG2D-Bindung im Vergleich zur N-terminalen Fusion des scFv-Fragments (scFv-Fc). Zusätzlich war bei SyD99-B5 ein Einfluss des verwendeten Linkers auf die Antigenbindung feststellbar. Linker 3 und 4 führten zu einer deutlich schwächeren NKG2D-Bindung, verglichen mit Linker 2 im gleichen Konstrukt.

Die SEC diente zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens der Fc-scFv-Antikörper (siehe Abbildung 5.20 und Anhang Abbildung 8.8). Zur Kontrolle wurden die scFv-Fc-Varianten der Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 ebenfalls vermessen. Die Antikörper lagen fast ausschließlich als Monomere vor und zeigten mit einem maximalen Anteil von 5 % Dimeren (und 2 % Aggregaten bei Fc-SyD99-B8 L2) nur eine sehr geringe Tendenz zur Bildung von Aggregaten. Die C-terminale Positionierung der Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 führte somit zu keiner verstärkten Aggregation.



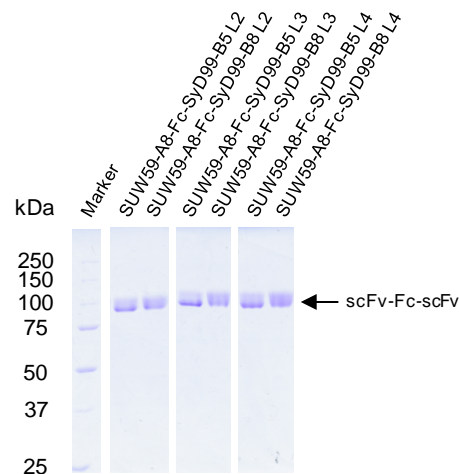


**Abbildung 5.20 SEC zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens von Fc-scFv-Antikörpern**

Die Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 wurden als scFv-Fc- und Fc-scFv-Varianten mittels SEC analysiert. Dafür wurden je 50-80  $\mu$ g Antikörper auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule chromatografisch aufgetrennt. Anhand der Peaks in den Chromatogrammen und einer Regressionsgeraden wurde die Größe der Proteine bestimmt. Durch Integration der Flächen unter den Peaks wurde der Anteil an Monomeren, Dimeren und größeren Aggregaten in den Proben ermittelt (Abbildung A). Abbildung B zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer Messung. In Abbildung C sind monomere scFv-Fc- und Fc-scFv-Antikörper schematisch dargestellt.

### 5.4.3 SEC mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format

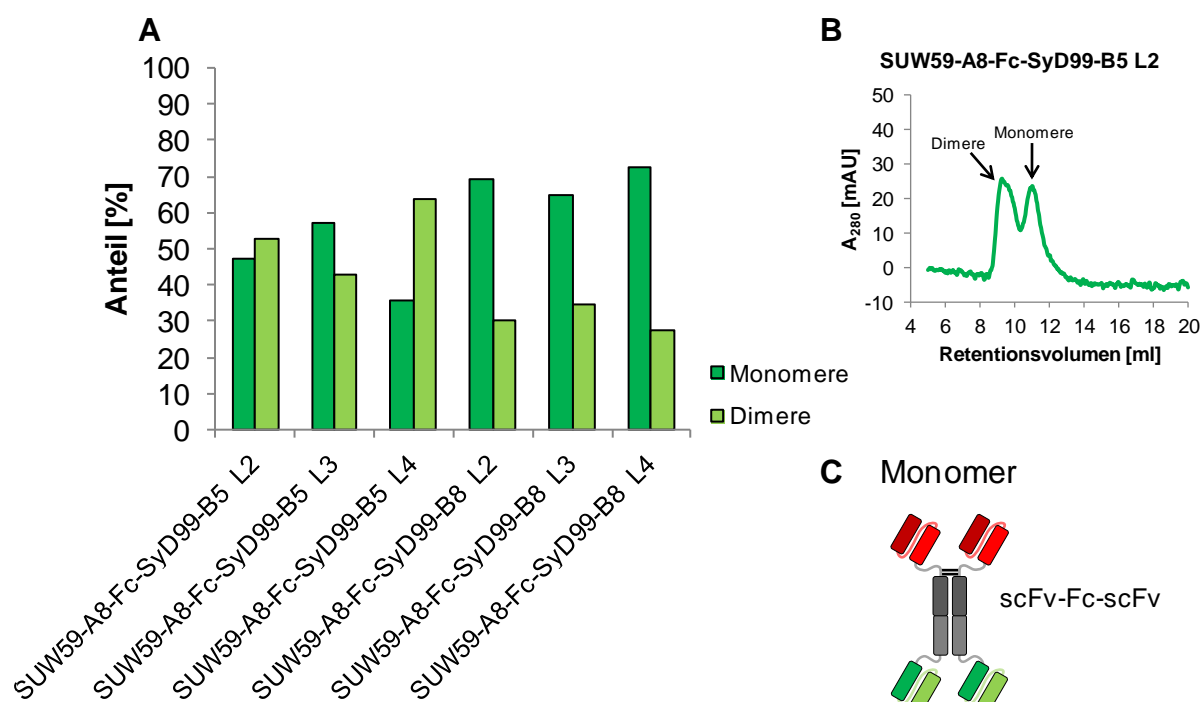
Nach der Analyse der Fc-scFv-Antikörper wurde der CEA-spezifische scFv-Antikörper SUW59-A8 in die Vektoren pCSE5.2-hIgG1-Fc-XP, pCSE5.3-hIgG1-Fc-XP und pCSE5.4-hIgG1-Fc-XP kloniert, die bereits die NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 oder SyD99-B8 enthielten. Die bispezifischen Antikörper wurden anschließend sekretorisch in HEK293-6E-Zellen produziert und mittels Protein A-Affinitätschromatografie gereinigt. Im Anschluss erfolgte eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung zur Kontrolle von Produktion und Reinigung (siehe Abbildung 5.21).



**Abbildung 5.21 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung der Produktion und Reinigung von scFv-Fc-scFv-Antikörpern**

Je 1 µg der scFv-Fc-scFv-Antikörper (mit unterschiedlichen Linkern L2, L3 und L4) wurde auf ein 10 % iges SDS-PAA-Gel aufgetragen und das Gel nach der SDS-PAGE mit Coomassie-Brilliantblau R250 gefärbt.

Im Anschluss an Produktion und Reinigung wurde das Aggregationsverhalten der scFv-Fc-scFv-Antikörper in einer SEC überprüft. Die analysierten Proben der bispezifischen Antikörper enthielten ausschließlich Mono- und Dimere (siehe Abbildung 5.22 und Anhang Abbildung 8.9). Größere Aggregate waren nicht vorhanden. Insgesamt neigten die scFv-Fc-scFv-Konstrukte sehr stark zur Bildung von Dimeren. ScFv-Fc-scFv-Antikörper, die den NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 enthielten, bildeten zu 43-64 % Dimere. Bei Konstrukten mit dem NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B8 waren zwischen 27 und 35 % Dimere in den Proben enthalten. Die Wahl und Kombination der scFv-Antikörper hatte folglich sehr großen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der scFv-Fc-scFv-Antikörper. Da das bispezifische scFv-Fc-scFv-Format zu einer verstärkten Bildung von Dimeren führte, wurde die Antigenbindung nicht weiter untersucht und das Format in dieser Arbeit nicht mehr verwendet.



**Abbildung 5.22 SEC mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format**

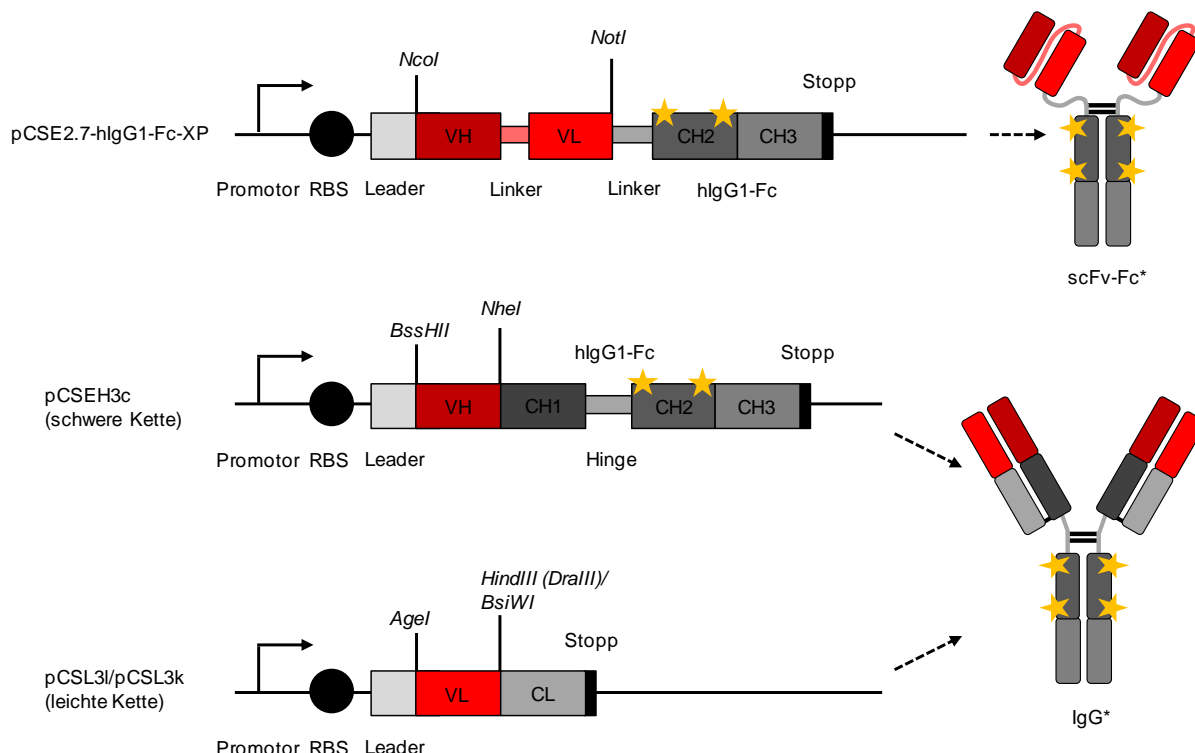
Je 80  $\mu$ g der Antikörper wurden auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule chromatografisch aufgetrennt. Anhand der Peaks in den Chromatogrammen und einer Regressionsgeraden wurde die Größe der Proteine bestimmt. Durch Integration der Flächen unter den Peaks wurde der Anteil an Monomeren und Dimeren in den Proben ermittelt (Abbildung A). Abbildung B zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer Messung. In Abbildung C ist ein Monomer eines scFv-Fc-scFv-Antikörpers schematisch dargestellt.

## **5.5 Mono- und bispezifische Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil**

### **5.5.1 Klonierung monospezifischer Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil**

Die CEA-spezifischen Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 wurden bisher im scFv-Fc und IgG-Format eingehend charakterisiert. Für funktionelle Analysen sollten die Antikörper zusätzlich zu den bereits vorhandenen Konstrukten als scFv-Fc- und IgG-Varianten mit ADCC-optimiertem (ADCC; antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität) Fc-Teil kloniert und produziert werden. Bei dem verwendeten Fc-Teil handelte es sich um eine Variante mit ADCC-optimierter Proteinsequenz (Fc\*). Durch Austausch zweier Aminosäuren in der CH2-Domäne (S239D und I332E) führt diese Variante zu einer Verstärkung der NK-Zell-vermittelten ADCC (Lazar *et al*, 2006). Die DNA der Fc-Variante wurde für diese Arbeit von Prof. Dr. Mattias Peipp (UKSH Kiel) zur Verfügung gestellt.

Bei der Klonierung der Fc\*-Varianten wurde zunächst der proteinoptimierte Fc-Teil in die Vektoren pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP und pCSEH1c kloniert und so die Vektoren pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP und pCSEH3c generiert. Die Vektoren pCSEH1c sowie pCSL3l und pCSL3k wurden von Dr. André Frenzel für die Versuche zur Verfügung gestellt (Frenzel, unveröffentlichte Daten). Anschließend wurden die CEA-spezifischen scFv-Fragmente mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* in den scFv-Fc\*-Expressionsvektor pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP kloniert. Zur Klonierung in den IgG\*-schwere Kette-Vektor pCSEH3c wurden die Restriktionsenzyme *BssHII* und *NheI* verwendet (siehe Abbildung 5.23).



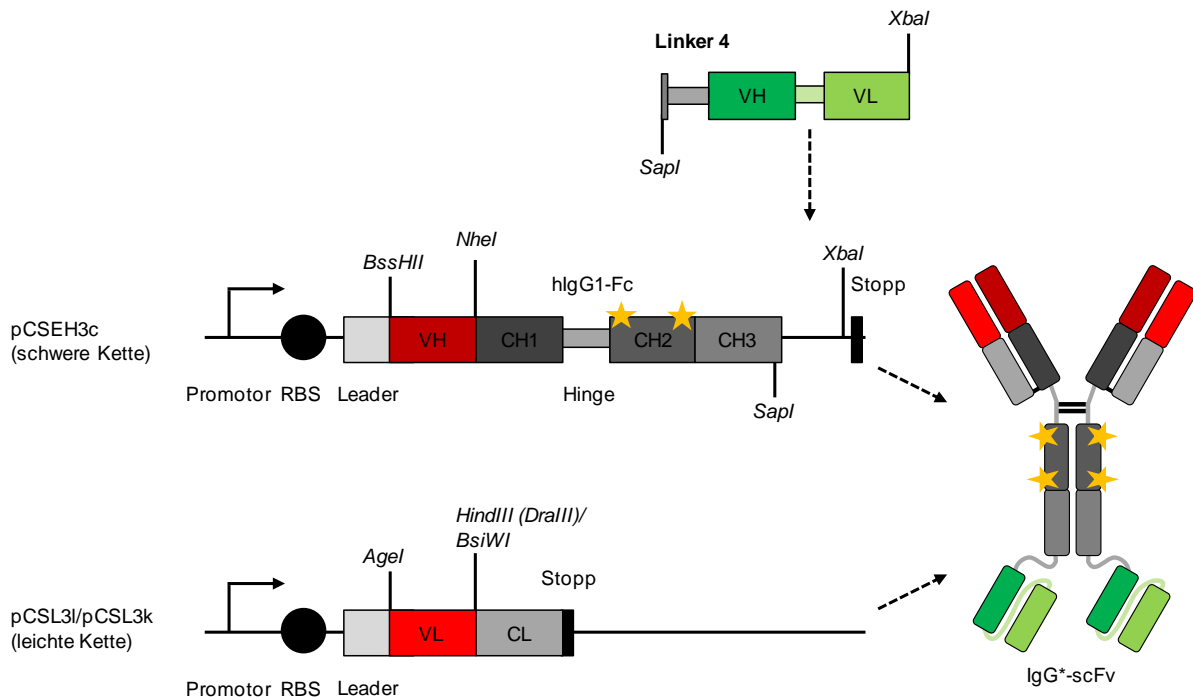
**Abbildung 5.23 Klonierungskassetten der Vektoren pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP, pCSEH3c, pCSL3l und pCSL3k**

Zur Generierung von CEA-spezifischen Antikörpern im scFv-Fc- und IgG-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil wurden die Vektoren pCSE2.7-hIgG1-Fc, pCSEH3c und pCSL3l verwendet. Die Vektoren pCSE2.7-hIgG1-Fc und pCSEH3c enthalten in der CH2 Aminosäureaustausche (S239D und I332E, symbolisiert durch gelbe Sterne), die zu einer Verstärkung des NK-Zell-vermittelten ADCC führen. Durch Restriktion mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* ist eine direkte Klonierung von scFv-Fragmenten in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.7-hIgG1-Fc-XP möglich. Die Restriktion mit den Enzymen *BssHII* und *NheI* ermöglicht die Klonierung der variablen Domäne der schweren Kette (VH) eines scFv-Antikörpers in den Vektor pCSEH3c. Die Vektoren pCSL3l und pCSL3k dienen zur Klonierung und Expression der leichten Kette (Lambda und Kappa) des IgG\*-Antikörpers. Die Klonierung der variablen Domäne der leichten Kette (VL) erfolgt für Lambda über *AgeI* und *HindIII* (oder *DraIII*) und für Kappa über *AgeI* und *BsiWI*.

Zusätzlich zu den CEA-spezifischen Antikörpern wurde der HER2-spezifische Antikörper 4D5-8 als Positivkontrolle für die funktionellen Assays in die Vektoren kloniert. Die DNA des scFv-Antikörpers 4D5-8 wurde von Prof. Dr. Matthias Peipp (UKSH Kiel) zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurde der CD33-spezifische scFv-Antikörper SUW61-IIC11 verwendet, der im Rahmen der eigenen Masterarbeit selektiert und charakterisiert wurde.

### 5.5.2 Klonierung bispezifischer Antikörper im IgG-scFv-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil

Da das bispezifische scFv-Fc-scFv-Format aufgrund der starken Dimerbildung nicht weiter verwendet wurde, wurden als Alternative Antikörper im IgG-scFv-Format generiert. Die bispezifischen Antikörper sollten zusätzlich den ADCC-optimierten Fc-Teil enthalten (IgG\*-scFv, siehe Abbildung 5.24).



**Abbildung 5.24 Klonierungsstrategie zur Generierung bispezifischer Antikörper im IgG\*-scFv-Format**

Ausgangspunkt für die Klonierung bispezifischer Antikörper im IgG\*-scFv-Format (mit ADCC-optimiertem Fc-Teil) bildeten die Vektoren pCSEH3c, pCSL3l und pCSL3k. Die IgG-leichte Kette-Vektoren pCSL3l und pCSL3k wurden unverändert verwendet. Der IgG\*-schwere Kette-Vektor pCSEH3c enthielt bereits die VH-Domänen der CEA-spezifischen Antikörper SUW59-A8 oder SUW119-H2 bzw. der Kontrollen 4D5-8 oder SUW61-IIC11. Zur Klonierung des C-terminal gelegenen scFv-Fragments wurde der Vektor mit *SapI* und *XbaI* geschnitten. Das scFv-Fragment wurde ebenfalls durch Restriktion mit *SapI* und *XbaI* aus dem Vektor pCSE5.4-hlgG1-Fc-XP geschnitten. Durch Verwendung von *SapI* wurde der Linker zum Fc-Teil (Linker 4) mit aus dem Vektor ausgeschnitten. Als scFv-Fragment wurde der NKG2D-spezifische Antikörper SyD99-B8 oder der Kontrollantikörper SUW61-IIC11 verwendet.

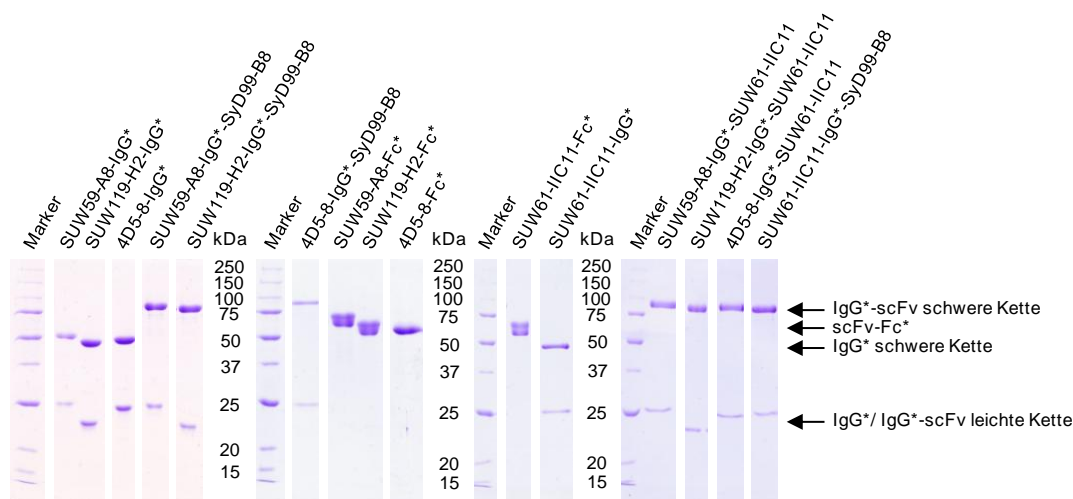
Als Ausgangspunkt wurden die bereits klonierten pCSEH3c-Vektoren mit ADCC-optimierten Fc-Teil und VH-Domänen der Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 sowie der Kontrollen 4D5-8 und SUW61-IIC11 genutzt.

Die Zielvektoren sowie der Vektor pCSE5.4-hlgG1-Fc-SyD99-B8 wurden mit *SapI* und *XbaI* geschnitten. Dadurch konnte der NKG2D-spezifische scFv-Antikörper SyD99-B8 mit Linker

C-terminal vom Fc-Teil in die Zielvektoren kloniert werden. Als Linker wurde hier nur die IgM-EMPD-basierte Variante (Linker 4) verwendet. Der Antikörper SyD99-B8 wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse gewählt. Als Negativkontrolle zu SyD99-B8 wurde der CD33-spezifische scFv-Antikörper SUW61-IIC11 verwendet.

### 5.5.3 Charakterisierung von Antikörpern im scFv-Fc-, IgG- und IgG-scFv-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil

Im Anschluss an die Klonierung erfolgte die Produktion der verschiedenen Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil in Säugerzellen. Dazu wurden HEK293-6E-Zellen transient mit den Vektoren transfiziert und die Antikörper sekretorisch produziert. Die Kulturüberstände wurden anschließend zur affinitätschromatografischen Reinigung mittels Protein A eingesetzt. Produktion und Reinigung wurden in einer SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung überprüft (siehe Abbildung 5.25).



**Abbildung 5.25 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung von Produktion und Reinigung von scFv-Fc\*, IgG\*- und IgG\*-scFv-Antikörpern**

Im Anschluss an die Produktion in HEK293-6E-Zellen und die Reinigung der Antikörper wurde je 1 µg (4D5-8-IgG\*-SyD99-B8: 0,1 µg) auf 12 % ige SDS-PAA-Gele aufgetragen und die Gele nach der SDS-PAGE mit Coomassie-Brilliantblau R250 gefärbt. Neben dem generellen Erfolg der Produktion und Reinigung wurde bei IgG-basierten Konstrukten das Vorhandensein der leichten und schweren Kette überprüft.

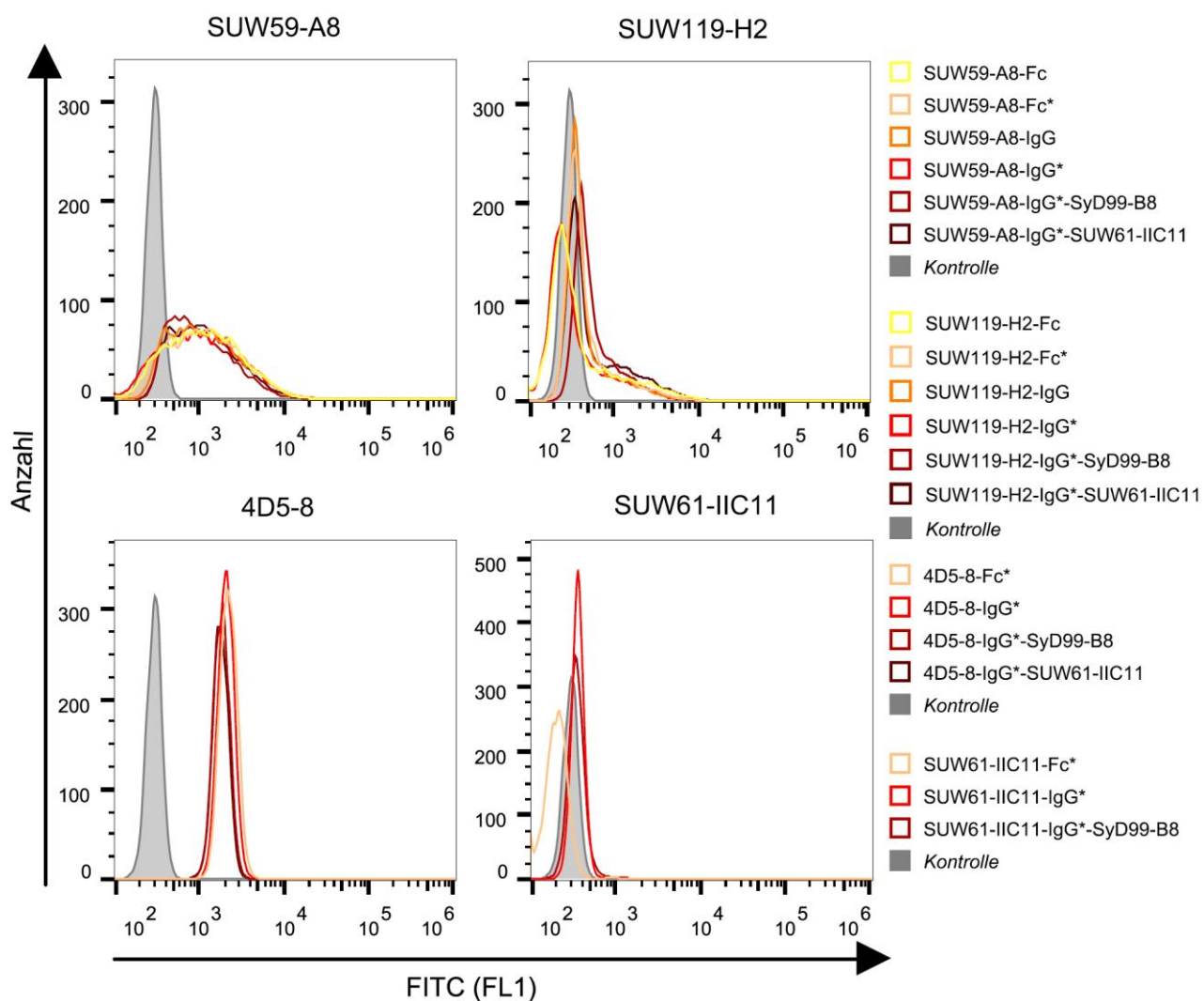
Im Anschluss wurde wie bei den bisherigen Konstrukten die Antigenbindung und das Aggregationsverhalten der Antikörper mittels Durchflusszytometrie und SEC untersucht. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Tumorzelllinien LS-174T und NK-92 verwendet. Bei LS-174T handelt es sich um eine sehr gut charakterisierte CEA-positive

Kolonkarzinom-Zelllinie (Tom *et al*, 1976), für die auch die Expression von HER2 beschrieben ist (Milenic *et al*, 2004). Daher sollte diese Zelllinie anschließend in den funktionellen Assays verwendet werden. Die Zelllinie NK-92 diene wie bisher zur Kontrolle der NKG2D-Bindung der Antikörper.

Bei den CEA-spezifischen Antikörpern SUW59-A8, SUW119-H2 und dem HER2-spezifischen Antikörper 4D5-8 konnte in allen Formaten eine Bindung auf CEA/HER2-positiven LS-174T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.26). Mit den SUW59-A8-basierten Konstrukten konnten im Vergleich zu den SUW119-H2-Antikörpern deutlich mehr Zellen angefärbt werden. Bei allen getesteten 4D5-8-Konstrukten wurden die Zellen zu 100 % angefärbt. Der CD33-spezifische Kontrollantikörper SUW61-IIC11 band nur sehr schwach an die Zielzellen.

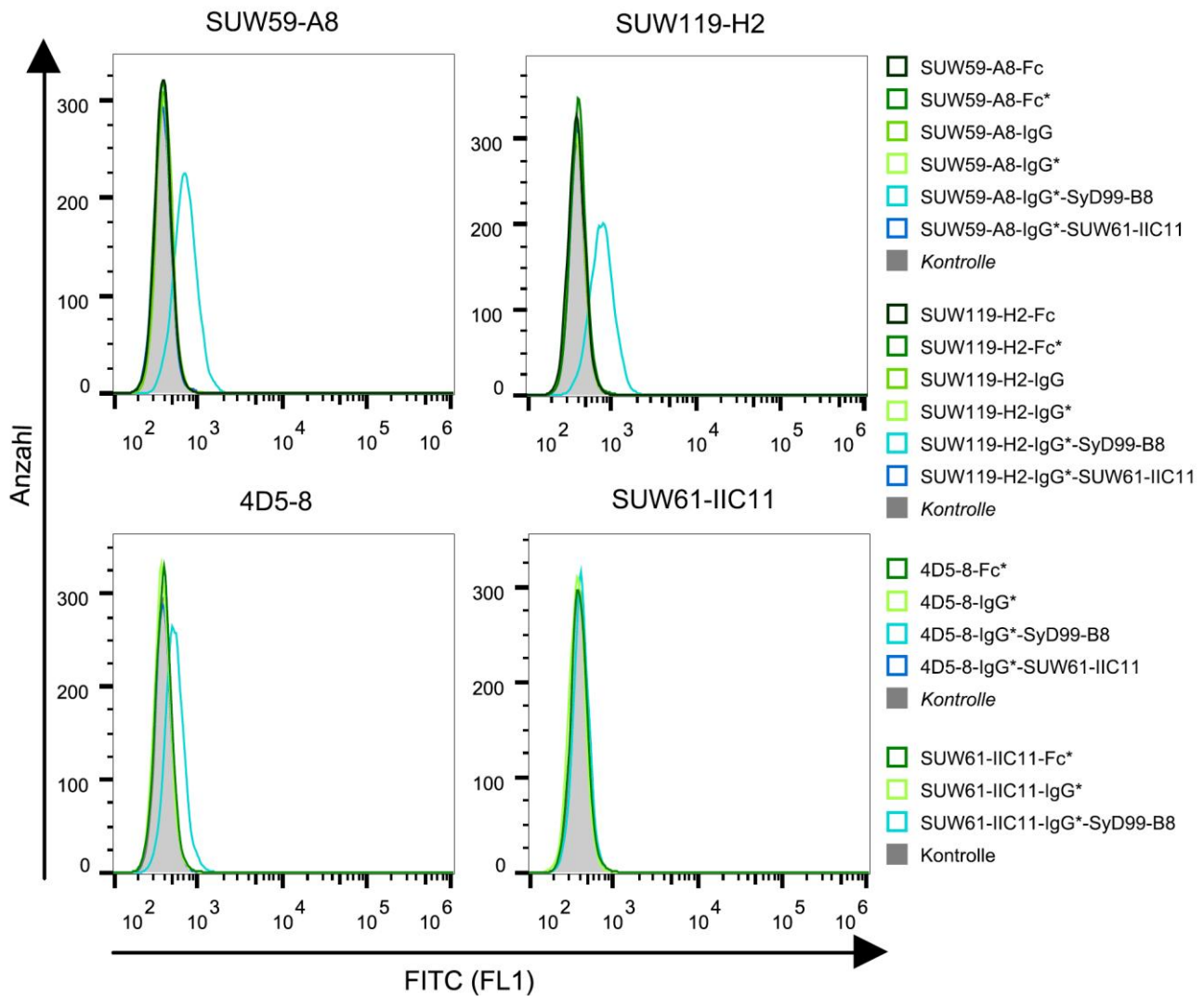
Auf NKG2D-exprimierenden NK-92-Zellen zeigten die CEA-spezifischen Antikörper SUW59-A8, SUW119-H2 und der HER2-spezifische Antikörper 4D5-8 in keinem Format eine Bindung (siehe Abbildung 5.27). Nur die bispezifischen IgG\*-scFv-Antikörper mit dem C-terminalen NKG2D-spezifischen scFv-Fragment SyD99-B8 banden auf den Zellen. Bei der IgG\*-scFv-Kombination aus 4D5-8 und SyD99-B8 war die Färbung jedoch deutlich schwächer als bei den anderen IgG\*-scFv-Konstrukten (SUW59-A8-IgG\*-SyD99-B8 und SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8). Für den CD33-spezifischen Antikörper SUW61-IIC11 konnte in keinem Format eine Färbung der Zellen nachgewiesen werden.





**Abbildung 5.26 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Antikörperformate auf LS-174T-Zellen**

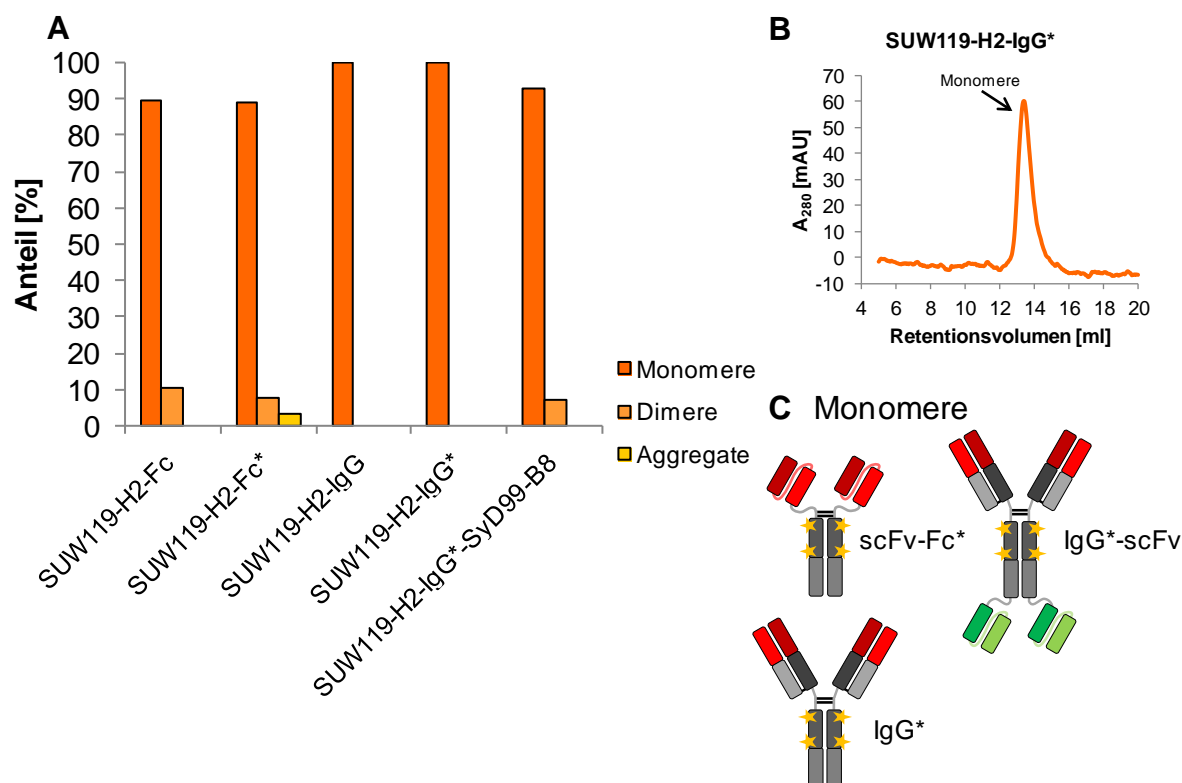
Je 200.000 Zellen wurden mit 25  $\mu\text{g/ml}$  CEA-, HER2- oder CD33-spezifischen Antikörpern in verschiedenen Formaten gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen analysiert. Als Referenz (Kontrolle) dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden.



**Abbildung 5.27 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Antikörperformate auf NK92-Zellen**

Je 200.000 Zellen wurden mit 25 µg/ml CEA-, HER2- oder CD33-spezifischen Antikörpern in verschiedenen Formaten gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen FITC-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human Fc ( $\gamma$ -spezifisch) Sekundärantikörper. Nach Zugabe von PI zur Anfärbung toter Zellen wurden pro Färbung 10.000 Zellen analysiert. Als Referenz (Kontrolle) dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden.

Ausgewählte Antikörper wurden im Anschluss an die Durchflusszytometrie in einer SEC vermessen. Wie am Beispiel des Antikörpers SUW119-H2 deutlich zu erkennen, führte die Änderung des Fc-Teils zu keiner verstärkten Aggregation (siehe Abbildung 5.28).



**Abbildung 5.28 SEC von SUW119-H2 in verschiedenen Antikörperformaten mit ADCC-optimiertem Fc-Teil (\*)**

Auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule wurden je 80 µg der Antikörper chromatografisch aufgetrennt. Anhand der Peaks in den Chromatogrammen und einer Regressionsgeraden wurde die Größe der Proteine bestimmt. Durch Integration der Flächen unter den Peaks wurde der Anteil an Monomeren, Dimeren und Aggregaten in den Proben ermittelt (Abbildung A). Zum Vergleich wurden scFv-Fc- und IgG-Varianten des Antikörpers im Diagramm mit dargestellt. Abbildung B zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer Messung. In Abbildung C sind die Monomere von scFv-Fc\*, IgG\*- und IgG\*-scFv-Antikörpern schematisch dargestellt.

Die IgG-Konstrukte neigten weniger zur Aggregation (100 % Monomere), als die scFv-Fc-Antikörper (89-90 % Monomere). Die bispezifischen Antikörper auf IgG-Basis zeigten ebenfalls eine deutlich geringere Tendenz zur Aggregation (93 % Monomere bei SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8), verglichen mit den entsprechenden bispezifischen scFv-Fc-scFv-Antikörpern (nur 36 - 73 % Monomere, siehe Abschnitt 5.4.3).

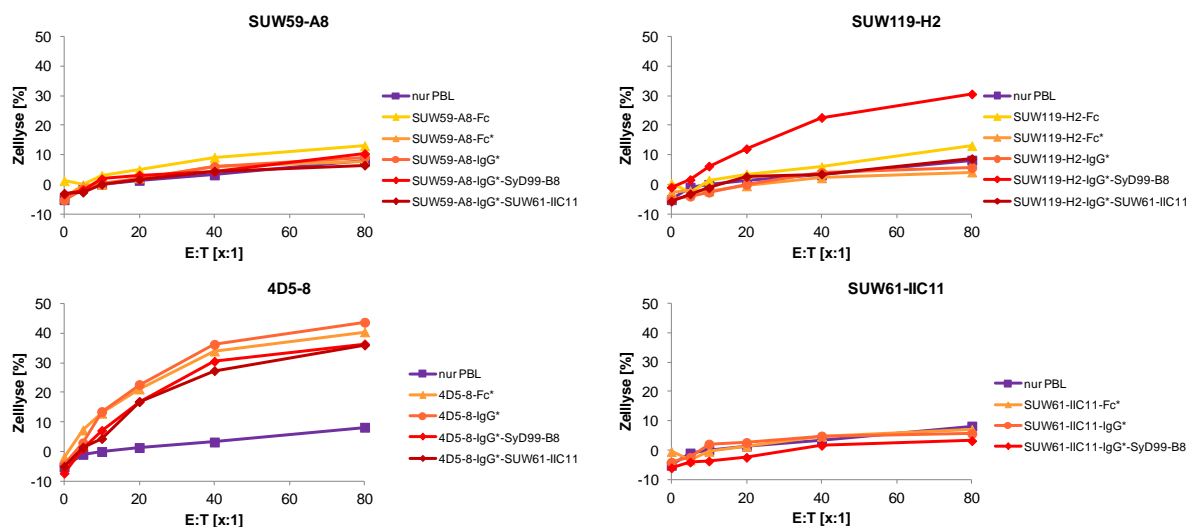
## 5.6 Funktionelle Analyse von Antikörpern in verschiedenen Formaten

Die Funktionalität der Antikörper in verschiedenen Formaten und mit oder ohne ADCC-optimiertem Fc-Teil wurde in einem Zytotoxizitätstest überprüft. Hierbei sollte der Einfluss des verwendeten tumorspezifischen Antikörpers, des Fc-Teils sowie des NKG2D-spezifischen Antikörpers auf die Lyse der Zielzellen untersucht werden. Für den Assay wurde eine nicht-radioaktive Variante mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM (Calcein-Acetoxymethylester) verwendet. Basierend auf den Angaben von Neri und Kollegen (Neri *et al*, 2001) wurde der Assay zunächst etabliert. Dabei wurden folgende Parameter optimiert: die verwendete Anzahl an Zielzellen, die Markierung der Zielzellen mit dem Farbstoff Calcein-AM, die Dauer des Assays und das verwendete Medium (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss an die Etablierung wurde der Assay für die Analysen der Antikörper eingesetzt.

### 5.6.1 Zytotoxizitätstest (ADCC) der mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukte

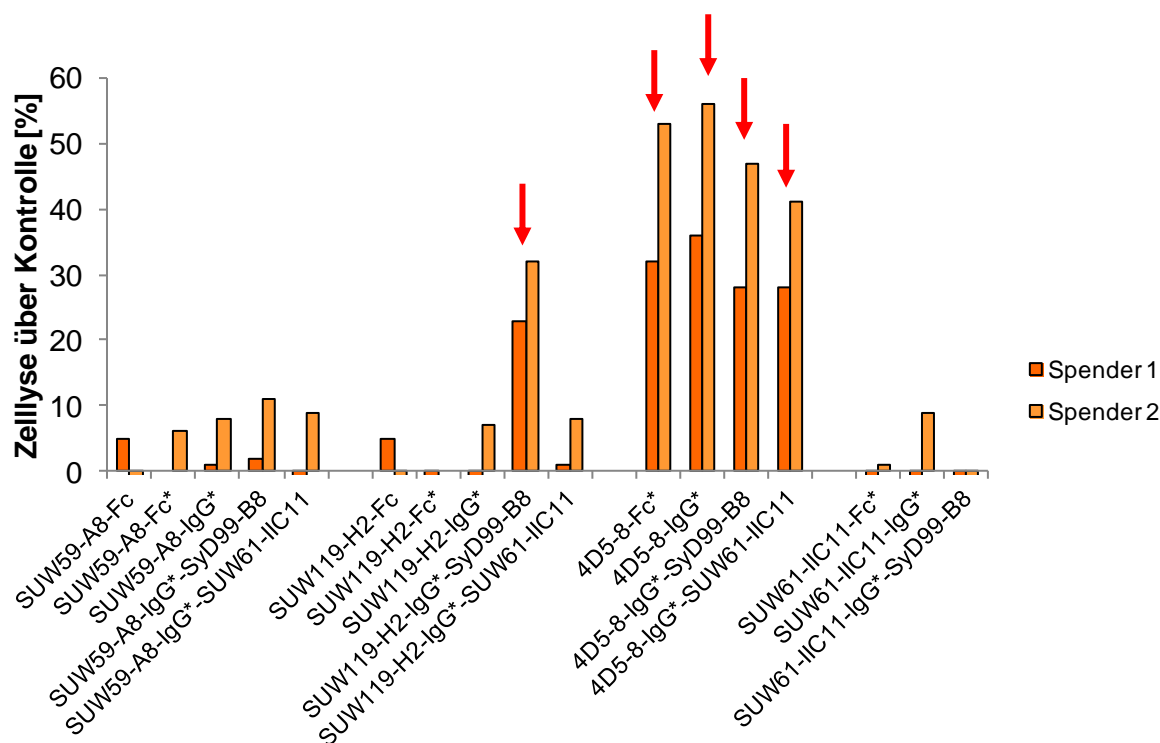
Im ersten ADCC-Assay wurde der Einfluss der verschiedenen Antikörperkonstrukte auf die Lyse von Zielzellen durch Effektorzellen untersucht. Als Zielzellen wurden CEA- und HER2-exprimierende LS-174T-Zellen verwendet. Als Effektorzellen sollten Fc-Rezeptor- und NKG2D-exprimierende NK-Zellen eingesetzt werden. Diese sind in Präparationen von peripheren Blutlymphozyten enthalten, weshalb diese für den Assay genutzt wurden (siehe Abbildung 5.29, Abbildung 5.30 und Anhang Abbildung 8.11). Für den Versuch wurden die peripheren Blutlymphozyten von zwei Spendern präpariert. Getestet wurden die Antikörper in den Formaten scFv-Fc, scFv-Fc\*, IgG\* und IgG\*-scFv.

Von den getesteten CEA-spezifischen Konstrukten zeigte nur der Antikörper SUW119-H2 als bispezifisches Konstrukt mit ADCC-optimiertem Fc-Teil und dem NKG2D-spezifische scFv-Fragment SyD99-B8 (IgG\*-scFv) eine Erhöhung der Zelllyse von 23 bzw. 32 % über der Kontrolle (Lyse durch die Lymphozyten allein). Bei der HER2-spezifischen Positivkontrolle 4D5-8 war in allen getesteten Formaten eine Lyse von 28 - 56 % über der Kontrolle nachweisbar. Die Negativkontrolle SUW61-IIC11 wies in keinem Format eine erhöhte Zelllyse auf.



**Abbildung 5.29 ADCC-Assay mit mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukten**

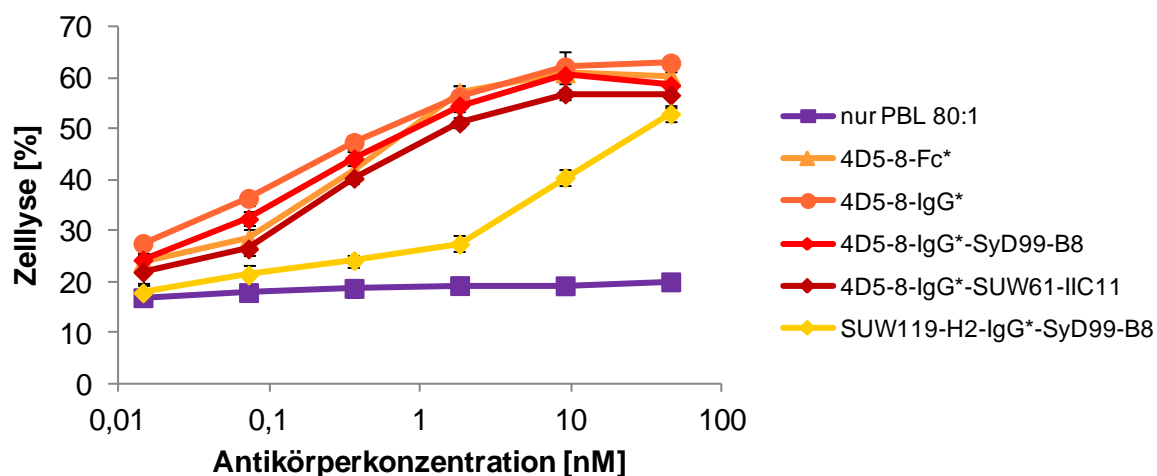
Für den ADCC-Assay wurden LS-174T-Zellen als Zielzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM markiert. Anschließend wurden die Zielzellen zusammen mit peripheren Blutlymphozyten von Spender 1 und 45,45 nM des jeweiligen Antikörpers in Mikrotiterplatten inkubiert. Die Lymphozyten wurden in Verhältnissen von 0:1 bis 80:1 (E:T; Effektorzellen : Zielzellen) eingesetzt. Sämtliche Ansätze wurden in Dublikaten getestet.



**Abbildung 5.30 Zusammenfassung der Ergebnisse des ADCC-Assays mit mono- und bispezifischen Antikörperkonstrukten**

Dargestellt sind die Ergebnisse für zwei unabhängige Experimente mit peripheren Blutlymphozyten zweier unterschiedlicher Spender. Die Abbildung zeigt die Erhöhung der Zelllyse (in %) im Vergleich zur Kontrolle (Lyse durch die Lymphozyten ohne Antikörper) bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 80:1 (E:T). Lysen von mehr als 20 % sind mit einem roten Pfeil markiert. Diese Konstrukte wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Das Ergebnis des ersten Tests wurde durch Titration der Antikörper im ADCC-Assay überprüft werden. Getestet wurden nur die Antikörper, die im ersten Assay eine deutlich erhöhte Zelllyse im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Für die Titration wurden erneut LS-174T-Zellen als Zielzellen und periphere Blutlymphozyten dreier unterschiedlicher Spender als Effektorzellen verwendet (siehe Abbildung 5.31 und Anhang Abbildung 8.12). Wie im ersten Test wurden mit dem Antikörper 4D5-8 unabhängig vom getesteten mono- und bispezifischen Format eine Erhöhung der Lyse von 37 - 43 % über der Kontrolle (nur Lymphozyten) erzielt. Der bispezifische Antikörper SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 führte ebenfalls zu einer verstärkten Lyse der Zielzellen von maximal 33 % über der Kontrolle.



**Abbildung 5.31 Titration von Antikörpern im ADCC-Assay**

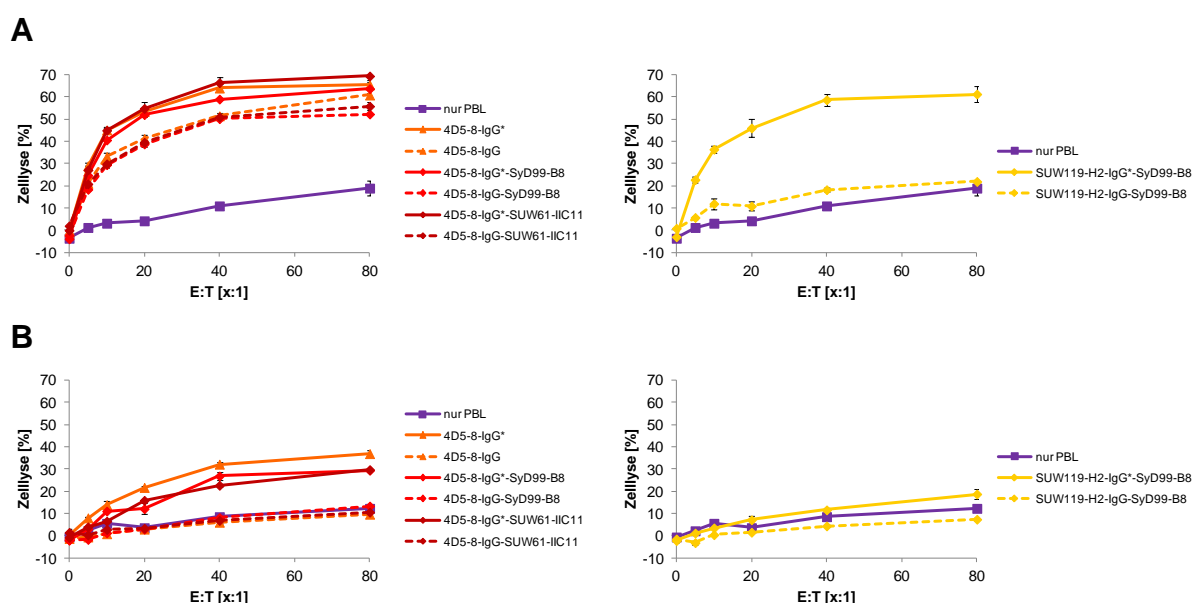
LS-174T-Zielzellen wurden mit Calcein-AM markiert. Periphere Blutlymphozyten und die markierten Zielzellen wurden anschließend im Verhältnis 80:1 (E:T) in Mikrotiterplatten eingesät. Die zu testenden Antikörper wurden zuvor in Konzentrationen von 15 pM bis 45 nM in die Vertiefungen gegeben. Sämtliche Proben wurden in Triplikaten analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit PBLs dreier unterschiedlicher Spender. Die Abweichung der einzelnen Werte wurde in Form des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM, *Standard error of the mean*) ermittelt.

### 5.6.2 Einfluss von Fc-Teil und NKG2D-spezifischem Antikörper auf die Zelllyse

Um den Einfluss des ADCC-optimierten Fc-Teils (Fc\*) und des NKG2D-spezifischen Antikörpers SyD99-B8 auf die Zelllyse genauer analysieren zu können, wurden die Fc-Teile in einer Klonierung gegen die nicht-optimierten Fc-Teile ausgetauscht.

Nach erfolgreicher sekretorischer Produktion in HEK293-6E-Zellen und Protein A-Affinitätsreinigung (siehe Anhang Abbildung 8.13) wurden die Antikörper im ADCC-Assay eingesetzt (siehe Abbildung 5.32). Für den Assay wurden die peripheren Blutlymphozyten

zweier unterschiedlicher Spender präpariert. In allen gewählten mono- und bispezifischen Formaten mit dem Antikörper 4D5-8 führte der Austausch des Fc-Teils zu einer deutlichen Reduktion der Zelllyse z.T. bis auf das Niveau der Hintergrundzelllyse, verglichen mit den Konstrukten mit ADCC-optimiertem Fc-Teil. Das Vorhandensein des C-terminalen scFv-Fragments im bispezifischen IgG-scFv-Format zeigte keinen Einfluss auf den Assay. Beim Antikörper SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 führte der Austausch des Fc-Teils ebenfalls zu Reduktion der Zelllyse bis auf das Niveau der Lymphozyten allein. Ein Einfluss des NKG2D-spezifischen Antikörpers auf die Lyserate konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.32 Einfluss von Fc-Teil und NKG2D-spezifischem Antikörper auf die Zelllyse im ADCC-Assay**

LS-174T-Zellen wurden als Zielzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM markiert. Anschließend wurden periphere Blutlymphozyten zweier Spender (A und B) zusammen mit den Zielzellen in Mikrotiterplatten gegeben. Die Lymphozyten wurden in Verhältnissen von 0:1 bis 80:1 (E:T; Effektorzellen : Zielzellen) eingesetzt. Zu den Zellen wurden jeweils 45,45 nM der Antikörper gegeben. Sämtliche Ansätze wurden in Triplikaten getestet. Die Abweichung der Triplikate wurde in Form des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM, *Standard error of the mean*) angegeben.





## 6 Diskussion

Seit den Anfängen der Entwicklung therapeutischer Antikörper in den 1980er Jahren (Ortho Multicenter Transplant Study Group, 1985) haben sich monoklonale Antikörper als wichtige und erfolgreiche Option für die Krebstherapie etabliert (Scott *et al*, 2012). Sie ermöglichen die Behandlung sowohl hämatologischer Krebsarten als auch solider Tumore (Scott *et al*, 2012). Die Vielzahl an möglichen Zielstrukturen erlaubt diverse Mechanismen, über die ein Antikörper therapeutische Effekte hervorrufen kann (Arlotta & Owen, 2019). Neue gentechnologische Verfahren zur Generierung humaner monoklonaler Antikörper wie transgene Mäuse oder das Phagendisplay (Übersicht bei Lonberg, 2005; Schirrmann *et al*, 2011), sowie neue *Screening*- und *Engineering*-Technologien bilden die Basis für die Entwicklung therapeutischer Antikörper in verschiedensten Formaten mit verbesserten Eigenschaften oder verstärkten bzw. neuen therapeutischen Effekten, sowie verringerter Immunogenität (Elgundi *et al*, 2017; Arlotta & Owen, 2019). Ziel dieser Arbeit war es humane monoklonale Antikörper gegen das Tumor-assoziierte Antigen CEA und das Effektorantigen NKG2D, welche zuvor mittels Phagendisplay und *Panning* selektiert wurden, in verschiedenen mono- und bispezifischen Antikörperformaten zu generieren und biochemisch zu charakterisieren. Eine funktionelle Analyse sollte anschließend aufzeigen, ob das gewählte Format bzw. der jeweilige Antikörper für eine Weiterentwicklung im Zusammenhang mit therapeutischen Zwecken grundlegend geeignet ist.

### 6.1 Generierung und Charakterisierung von CEA-spezifischen monoklonalen Antikörpern im scFv-Fc-Format

Als Ausgangspunkt für die Generierung monoklonaler Antikörper im scFv-Fc-Format wurden scFv-Fragmente aus den Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 verwendet (Hust *et al*, 2011). Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten scFv-Fragmente aus den Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 besitzen eine leichte Kette vom Typ Lambda. Die präferierte Selektion von Antikörperfragmenten aus der Lambda-Bibliothek HAL7 im

Vergleich zur Kappa-Bibliothek HAL8 wurde bereits von Hust und Kollegen beschrieben (Hust *et al*, 2011).

ScFv-Antikörperfragmente eignen sich sehr gut für *in vitro* Anwendungen wie die Selektion mittels Phagen- oder Ribosomendisplay (Hoogenboom, 2005) und Expression in verschiedensten Systemen wie z.B. Bakterien, Säugerzellen oder Hefen (Überblick in Verma *et al*, 1998). Durch Fusion mit einem IgG-Fc-Teil können scFv-Fragmente in ein IgG-äquivalentes Format überführt werden, welches ähnliche Eigenschaften wie Bivalenz (Jäger *et al*, 2013) sowie Fc-vermittelten Effektorfunktionen (Shu *et al*, 1993) aufweist und darüber hinaus eine höhere Stabilität und längere Plasma-Halbwertszeiten im Vergleich zu Antikörperfragmenten besitzt (Jain *et al*, 2007). Die molekulare Masse von scFv-Fc-Proteinen ist mit 105-110 kDa etwas geringer als die vollständige IgGs mit ca. 150 kDa (Kontermann, 2009), wodurch eine bessere Gewebedurchdringung erreicht wird (Holliger & Hudson, 2005).

Für die Generierung von monoklonalen Tumorantigen-spezifischen Antikörpern im scFv-Fc-Format wurden in dieser Arbeit scFv-Antikörperfragmente verwendet, die zuvor gegen das Tumor-assoziierte Antigen CEA selektiert wurden. Das Antigen CEA eignet sich aufgrund seiner begrenzten Expression im gesunden Gewebe und des stark veränderten Expressionsmusters in malignen Gewebe gut als Zielmolekül für eine therapeutische Anwendung. Darüber hinaus sind die physiologische Funktion und veränderte Funktion im Tumorgewebe langjährig erforscht und vielfach beschrieben (Überblick in Hammarström, 1999; Beauchemin & Arabzadeh, 2013).

Die gegen CEA selektierten scFv-Antikörperfragmente wurden zunächst aus dem Phagemidvektor in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert. Die Verwendung von aufeinander abgestimmten Klonierungskassetten in beiden Vektoren ermöglichte hierbei die direkte Überführung des scFv-Fragments in den Expressionsvektor und die Expression des Antikörperfragments als Fusionsprotein mit humanem IgG1-Fc-Teil. Im Anschluss an die Klonierung wurden HEK293-6E-Zellen transient mit dem Expressionsvektor transfiziert und die scFv-Fc-Antikörper sekretorisch produziert. Für den Antikörper SUW59-A8 erfolgten diese Schritte bereits im Rahmen der eigenen Masterarbeit. Die Verwendung von HEK293-6E-Zellen und des Expressionsvektors pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP erlaubt, wie bereits von Jäger und Kollegen beschrieben, die hoch-effiziente Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen (Jäger *et al*, 2013). Der Erfolg der Produktion CEA-spezifischer scFv-Fc-Antikörper wurde in

dieser Arbeit im Titrations-ELISA überprüft. Der scFv-Fc-Antikörper SUW59-A8-Fc erreichte hierbei seine halbmaximale Antigenbindung bei geringeren Konzentrationen als der Antikörper SUW119-H2-Fc. Dies weist auf eine höhere Affinität des Antikörpers zum Antigen oder eine höhere apparente/funktionelle Affinität bedingt durch Aviditätseffekte des bivalenten scFv-Fc-Formats hin. Zusätzlich können durch die Immobilisierung des Antigens auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte sterische sowie konformationelle Effekte auftreten, die die Zugänglichkeit des Epitops im Antigen verändern und so das Ergebnis des ELISAs beeinflussen. Diese Faktoren sowie deren Einfluss auf das Ergebnis eines ELISA-Assays mit immobilisiertem Antigen wurden ebenfalls von Vos und Kollegen (Vos *et al*, 1987) sowie Underwood (Underwood, 1993) beschrieben.

Die spezifische Antigenbindung und Reaktivität der scFv-Fc-Antikörper in Gegenwart einer Vielzahl an humanen Proteinen wurde mittels Durchflusszytometrie und Western Blot mit Immunfärbung überprüft. Für den Nachweis wurden HEK293-6E-Zellen transient mit dem vollständigen CEA-Antigen transfiziert. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse lässt darauf schließen, dass die transfizierten HEK293-6E-Zellen das Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren und beide scFv-Fc-Antikörper, SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc, spezifisch daran binden. Der Western Blot mit anschließender Immunfärbung bestätigte das Resultat. Zhou und Kollegen exprimierten CEA nach stabiler Transfektion auf der Oberfläche von CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*-Zellen) zur Überprüfung der Spezifität von anti-CEA-Antikörpern und deren Einfluss auf die CEA-vermittelte Adhäsion (Zhou *et al*, 1993). Pavoni *et al*. nutzten die transiente Transfektion von BOSC23-Zellen (Derivat der Zelllinie HEK293-T; Pear *et al*, 1993) zur Expression verschiedener Mitglieder der CEACAM-Familie auf der Zelloberfläche und zum anschließenden Nachweis der spezifischen Antigenbindung eines affinitätsgereiften scFv-Fragments (Pavoni *et al*, 2006).

Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der Antigenspezifität beider Antikörper gegenüber endogen exprimiertem CEA auf einer Reihe von Tumorzelllinien. Die durchflusszytometrische Analyse sowie der Western Blot mit Immunfärbung auf Zelllysaten bestätigten die spezifische Bindung beider scFv-Fc-Antikörper an das endogene CEA. Im Unterschied zum Test auf rekombinant exprimiertem CEA, konnte für den Antikörper SUW119-H2-Fc nur eine schwache Bindung in der durchflusszytometrischen Analyse sowie

auf dem nicht-reduzierten Lysat der CEA-exprimierenden Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür können Splice-Varianten des endogenen CEA sein (Peng *et al*, 2012; Hatakeyama *et al*, 2013), wodurch das Epitop ggf. nur in einem Teil des exprimierten Antigens vorhanden ist. Für die Tumorzelllinie LOVO konnte die Expression von Splice-Varianten bereits von Hatakeyama und Kollegen nachgewiesen werden (Hatakeyama *et al*, 2013). Des Weiteren sind für das Antigen CEA verschiedene natürliche Varianten durch Aminosäureaustausche beschrieben (The UniProt Consortium, 2019).

Neben der Variabilität der Proteinsequenz sind für CEA Unterschiede in der Glykosylierung bei der Expression des Antigens durch Tumorzellen im Vergleich zu normalen Kolonzellen beschrieben (Garcia *et al*, 1991; Saeland *et al*, 2012). Entsprechend sind auch Unterschiede in der Glykosylierung von rekombinant in HEK293-6E-Zellen exprimiertem CEA und endogenem CEA von Tumorzelllinien wahrscheinlich, welche die Antigenbindung durch die Antikörper SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc beeinflussen können.

Möglich ist auch ein Einfluss der Lokalisation des Antigens auf der Zelloberfläche im Zusammenspiel mit Aviditätseffekten. Beim rekombinant exprimierten CEA auf HEK293-6E-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass das Antigen nach der Transfektion in sehr hoher Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wodurch der Nachweis mit beiden Antikörpern, SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc, möglich war. Die Analyse der Bindung an endogen exprimiertem CEA auf Tumorzelllinien ergab hingegen nur einen schwachen Nachweis für den Antikörper SUW119-H2-Fc. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Titrations-ELISAs ist daher anzunehmen, dass der Antikörper SUW119-H2-Fc eine geringere Affinität zum Antigen besitzt, als der Antikörper SUW59-A8-Fc. Die hohe Dichte des rekombinant exprimierten Antigens auf der Zelloberfläche der HEK293-6E-Zellen und die dadurch mögliche bivalente Antigenbindung können wie von Plückthun und Pack beschrieben durch Aviditätseffekte die Bindungsstärke eines Antikörpers deutlich verbessern (Plückthun & Pack, 1997). Die Dichte des endogen exprimierten Antigens auf den Tumorzellen ist vermutlich hierfür nicht ausreichend. Dennoch konnte eine schwache spezifische Bindung detektiert werden, die wahrscheinlich darauf beruht, dass CEA als GPI-verankertes Protein in sog. *Lipid rafts* lokalisiert sein kann (Screaton *et al*, 2000), wodurch eine räumliche Nähe der Moleküle entsteht. Anderson und Kollegen konnten zeigen, dass die Assoziation von *Lipid rafts* zu einer Konzentrierung von MHC-Klasse II-Molekülen führt, wodurch eine effiziente Antigenpräsentation bei geringer Ligandendichte gewährleistet wird (Anderson *et al*, 2000).

Nach der Analyse der CEA-Spezifität der scFv-Fc-Antikörper SUW59-A8-Fc und SUW119-H2-Fc wurde deren Affinität zum Antigen mittels Oberflächenplasmonresonanzmessungen bestimmt. Zusätzlich zum bisher analysierten scFv-Fc-Format wurden beide Antikörper auch im IgG-Format analysiert. Für den Antikörper SUW59-A8 konnten in beiden Formaten vergleichbare Gleichgewichtsdissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich ( $K_D = 2,03 \times 10^{-8}$  M im scFv-Fc-Format und  $K_D = 4,31 \times 10^{-8}$  M im IgG-Format) ermittelt werden. Die Affinität von rekombinanten Antikörpern, welche mittels *in vitro* Selektion isoliert werden, liegt vor Affinitätsreifung typischer Weise im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich (Dübel *et al.*, 2010).

Für den Antikörper SUW119-H2 konnte in keinem der beiden Formate eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante bestimmt werden. Ein anderer Versuchsaufbau mit bivalentem Analyten ermöglichte den Nachweis der Antigenbindung sowie die Bestimmung zweier Assoziations- und Dissoziationskonstanten. Die Auswertung der Messergebnisse zeigt, dass die Antigenbindung von SUW119-H2-Fc und SUW119-H2-IgG abhängig von Aviditätseffekten ist. Wie von Hornick und Karush beschrieben, führt Multivalenz zu einer Steigerung der Bindungsstärke (Hornick & Karush, 1972), wobei in verschiedenen Modellen und experimentellen Untersuchungen die Liganden- bzw. Epitopdichte als wichtiger Faktor für die Stärke des Effekts angeführt wird (Pack *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1998). Bei hohen Epitopdichten kann die bivalente Bindung eines Antikörpers die funktionelle Affinität im Vergleich zur monovalenten Interaktion bis zu 1000-fach verstärken (Plückthun & Pack, 1997). Bei IgM-Antikörpern ist der Aviditätseffekt aufgrund der pentameren Struktur und Multivalenz (10 Fab-Arme) noch höher als bei IgG-Molekülen (Hudson, 1999). Das Ergebnis der Oberflächenplasmonresonanzmessungen bestätigt somit die bisherigen Annahmen bzgl. der Affinität des Antikörpers SUW119-H2-Fc und möglicher Aviditätseffekte bei der Antigenbindung.

Die Analyse des Aggregationsverhaltens der Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 im scFv-Fc- und IgG-Format wurde mittels Größenausschlusschromatografie durchgeführt. Generell stellt die Aggregation von Antikörper ein Risiko im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung dar, da sie die Möglichkeit einer unerwünschten Immunreaktion des Patienten erhöhen kann (Rosenberg, 2006; Moussa *et al.*, 2016). Aggregate entstehen, wenn Proteine einer Form von Stress ausgesetzt sind. Bei der rekombinanten Herstellung von Antikörpern

können dies z.B. Hitze, der pH-Wert, hohe Konzentrationen (Lowe *et al*, 2011) oder mechanische Belastung sein (Lahlou *et al*, 2009). Darüber hinaus wird die Neigung zur Aggregation durch die Sequenz und tertiäre Struktur eines Antikörpers bestimmt (Li *et al*, 2016) und durch posttranslationale Modifikation beeinflusst (Jenkins *et al*, 2008). Durch partielle Entfaltung eines Antikörpers können die Monomere assoziieren und letztendlich Aggregate bilden (Li *et al*, 2016).

Die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 zeigten sowohl im scFv-Fc- als auch im IgG-Format insgesamt eine geringe Tendenz zur Aggregation. Der Antikörper SUW119-H2 bildete lediglich im scFv-Fc-Format zu einem Prozentsatz von 10 % Dimere und keine größeren Aggregate. Da der Antikörper im IgG-Format keinerlei Aggregation zeigte und beide Formate den natürlich vorkommenden humanen IgG1-Fc enthielten, basiert die Aggregation wahrscheinlich auf intermolekularen Interaktionen im scFv-Fragment. Die Neigung von scFv-Fragmenten zur Dimerisierung oder Aggregation hängt stark von der Sequenz der CDRs, der intrinsischen Stabilität der VH- und VL-Domäne sowie der Stabilität des VH-VL-Interface ab. Eine unzureichende Stabilität im VH-VL-Interface kann zur transienten Öffnung des Interface und Offenlegung hydrophober Bereiche führen, was die Aggregation der Moleküle begünstigt. (Wörn & Plückthun, 2001) Die Dimerisierung von scFv-Fragmenten ist ein vielfach beschriebener Prozess, bei dem es zur Interaktion der komplementären V-Domänen zweier Moleküle kommt. Basierend auf dieser Interaktion können nichtkovalente funktionelle *Diabodies* (Holliger *et al*, 1993) gebildet werden, welche aus zwei scFv-Fragmenten mit gleicher oder unterschiedlicher Antigenspezifität bestehen und somit die bivalente oder bispezifische Antigenbindung ermöglichen.

Der Antikörper SUW59-A8 zeigte eine etwas stärker ausgeprägte Tendenz zur Aggregation. Hier konnten in der Größenausschlusschromatografie sowohl im scFv-Fc-Format als auch im IgG-Format Dimere und größere Aggregate nachgewiesen werden. Da die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 in sämtlichen Formaten den gleichen Fc-Teil enthielten, ist davon auszugehen, dass die Neigung zur Aggregation auf intermolekularen Interaktionen des scFv-Fragments im scFv-Fc-Format bzw. des Fab-Fragments im IgG beruht. Fab-Fragmente können stabiler sein als scFv-Fragmente, aber auch hier kann es z.B. durch die Sequenz der CDR-Regionen zu Instabilität und Aggregation kommen (Li *et al*, 2016).

Die Aggregationsneigung eines Antikörpers kann durch verschiedene Maßnahmen verringert werden. Häufig verwendet wird die Veränderung der Formulierung des Produkts (Lowe *et al*, 2011). Hierbei kann durch die Änderung einer Vielzahl an Parametern, wie z.B. des pH-Wert oder der Ionenstärke, sowie der Zugabe von Hilfsstoffen die Stabilität des Antikörpers erhöht werden (Manning *et al*, 1995). Möglich ist auch das Einfügen von Mutationen oder die Änderung des Antikörperisotyps (Lowe *et al*, 2011).

Im Anschluss an die biochemische Charakterisierung der Antikörper erfolgte die Bestimmung der Antikörperbindungsgebiete (Epitope) im Antigen CEA. Der Bindungsbereich konnte für beide Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 auf die N-Domäne und die darauf folgende A1-Domäne eingegrenzt werden. Im Western Blot mit Immunfärbung auf rekombinant exprimiertem Antigen konnte die Bindung beider Antikörper auf dem unter reduzierenden Bedingungen vorbehandelten Zelllysate nachgewiesen werden, was auf die Bindung eines linearen Epitops hinweist. Der Sequenzvergleich der N-Domäne und A1-Domäne mit den entsprechenden Domänen des stark homologen CEACAM-Familienmitglieds CEACAM1, welches für die Negativselektion im *Panning* benutzt wurde, könnte auf eine Bindung der Antikörper im C-terminalen Bereich der A1-Domäne hindeuten. In diesem Bereich befindet sich eine größere Anzahl von Aminosäuren, die sich zwischen CEA und CEACAM1 unterscheiden.

Hatakeyama und Kollegen konnten zeigen, dass die auch in dieser Arbeit verwendete Tumorzelllinie LOVO neben dem vollständigen CEA zwei Splicevarianten exprimiert, von denen eine keine A1-Domäne enthält. Des Weiteren wies die Zelllinie LOVO im Vergleich zu anderen getesteten Tumorzelllinien eine geringere CEA-Überexpression auf. (Hatakeyama *et al*, 2013) In der durchflusszytometrischen Analyse des Antikörpers SUW59-A8 im scFv-Fc-Format war der Anteil gefärbter Zellen bei SW-403-Zellen deutlich höher als bei LOVO-Zellen. Dies könnte auf das Vorliegen der Splicevariante ohne A1-Domäne sowie die insgesamt geringere Überexpression des Antigens CEA durch die Zelllinie LOVO zurückgeführt werden und ist somit ein weiterer Hinweis auf die mögliche Lokalisation des Epitops in der A1-Domäne. Bei SUW119-H2-Fc ist keine eindeutige Bestätigung anhand der durchflusszytometrischen Analyse möglich, da mit diesem Antikörper nur ein geringer Anteil an Zellen beider Zelllinien gefärbt werden konnte.

## **6.2 Generierung und Charakterisierung von NKG2D - spezifischen monoklonalen Antikörpern im scFv-Fc-Format**

Nach der Charakterisierung der Tumorantigen-spezifischen Antikörper erfolgte die biochemische Analyse von Antikörpern gegen das Effektorzellantigen NKG2D. Alle fünf getesteten Antikörper banden im Titrations-ELISA spezifisch an das rekombinant hergestellte Effektorantigen NKG2D, wobei die halbmaximale Bindung bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen erreicht wurde, was auf unterschiedliche Affinitäten der Antikörper oder apparente Affinitäten durch Aviditätseffekte hinweist. Die Antikörper SyD99-B5-Fc, SyD99-B8-Fc und SyD99-C1-Fc erreichten die halbmaximale Bindung schon bei geringen Antikörperkonzentrationen.

Nach dem Titrations-ELISA wurde die spezifische Antigenbindung auf HEK293-6E-Zellen untersucht, die das rekombinante NKG2D auf der Zelloberfläche exprimieren. NKG2D wird zusammen mit dem Adapterprotein DAP10 als hexamerer Komplex auf der Zelloberfläche von Effektorzellen exprimiert. Hierzu assembliert der hexamere Komplex aus einem NKG2D-Dimer und zwei DAP10-Dimeren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). (Garrity *et al*, 2005) Die Assoziation der NKG2D- und DAP10-Dimere findet über geladene Reste in den Transmembrandomänen statt (Wu *et al*, 1999). Viele aktivierende Rezeptoren wie der T-Zell-Rezeptorkomplex besitzen einen ähnlichen modularen Aufbau aus einer Liganden-bindenden Einheit und nicht-kovalent assoziierten Signalmodulen (Call & Wucherpfennig, 2007).

Pende und Kollegen sowie Horng *et al*. konnten zeigen, dass eine Expression von NKG2D auf der Oberfläche von transient transfizierten HEK293-T-Zellen nur in Verbindung mit der Expression des Adapterproteins DAP10 möglich ist, DAP10 aber auch ohne NKG2D auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann (Pende *et al*, 2001; Horng *et al*, 2007). Entsprechend wurden in dieser Arbeit HEK293-6E-Zellen mit NKG2D und DAP10 cotransfiziert oder Einzeltransfektionen mit NKG2D oder DAP10 durchgeführt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Pende *et al*. und Horng *et al*. erfolgte die Expression von NKG2D nur nach Cotransfektion mit dem Adapterprotein DAP10 und konnte spezifisch mit den Antikörpern SyD7-H2-Fc, SyD99-B5-Fc, SyD99-B8-Fc und SyD101-E7-Fc nachgewiesen werden. Die



Expression des Adapterproteins war auch nach Einzeltransfektion mit DAP10 über das fusionierte FLAG-Tag möglich.

Im Western Blot mit Immunfärbung auf Zelllysaten konnte bei keinem der Antikörper eine spezifische oder unspezifische Antigenbindung nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Antikörper ein konformationelles Epitop binden, welches durch die Vorbehandlung der Zelllysate nicht erhalten bleibt.

Die spezifische Bindung des endogen exprimierten NKG2D wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der NK-Zelllinie NK-92 untersucht, für welche die Expression von NKG2D beschrieben ist (Maki *et al.*, 2001). Für zwei der getesteten fünf Antikörper, SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc, konnte eine spezifische Bindung auf der Oberfläche von NK-92-Zellen nachgewiesen werden. Im anschließenden Western Blot mit Immunfärbung konnte für keinen der Antikörper ein spezifisches Signal detektiert werden. Bei den Antikörpern SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc kann daher davon ausgegangen werden, dass ein konformationelles Epitop gebunden wird. Da die übrigen Antikörper SyD7-H2-Fc, SyD99-C1-Fc und SyD101-E7-Fc in der durchflusszytometrischen Analyse nur eine sehr schwache Bindung aufwiesen, ist es neben der Erkennung eines konformationellen Epitops auch möglich, dass keine Antigenbindung im Western Blot stattfand.

Der Unterschied in der Bindung der Antikörper auf rekombinatem und endogenem NKG2D ist vermutlich auf eine veränderte Konformation oder natürliche Varianten des endogenen Antigens, die durch Aminosäureaustausche entstehen, zurückzuführen. Aminosäureaustausche können Einfluss auf die Struktur eines Proteins haben oder die Sequenz eines Epitops verändern. Für NKG2D sind bisher zwei natürliche Varianten mit Aminosäureaustauschen am Übergang der transmembranen zur extrazellulären Domäne und innerhalb der extrazellulären Domäne beschrieben (The UniProt Consortium, 2019). Antigenisoformen, die durch alternatives Splicen entstehen und ebenfalls strukturellen Einfluss besitzen oder das Fehlen eines Epitop bedingen, sind für NKG2D nicht bekannt (The UniProt Consortium, 2019).

Darüber hinaus ist ein Einfluss der Glykosylierung des Rezeptors auf die Epitoperkennung und -bindung möglich. Die Glykosylierung von Antigenen kann zur Maskierung eines Epitops führen oder dessen Bindung begünstigen, indem die Oligosaccharide selbst an der Bindung beteiligt sind oder die Exposition sowie sterische Anordnung des Epitops

unterstützen (Lisowska, 2002). Ein weiterer Faktor ist, basierend auf den Ergebnissen des Titrations-ELISAs, die unterschiedliche Affinität oder apparente Affinität der Antikörper zum Antigen.

Aufgrund ihrer spezifischen Bindung sowohl an das rekombinante als auch endogene Antigen NKG2D wurden die Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc für die weiteren Versuche verwendet und ihre Affinität zum Antigen mittels Oberflächenplasmonresonanz bestimmt. Beide Antikörper wiesen mit Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von  $K_D = 2,57 \times 10^{-7} \text{ M}$  (SyD99-B5-Fc) und  $K_D = 3,98 \times 10^{-8} \text{ M}$  (SyD99-B8-Fc) mittlere Affinitäten zum Antigen NKG2D auf. Beide Antikörper zeigen ähnliche Assoziationsraten, wohingegen der Antikörper SyD99-B5-Fc deutlich schneller von Antigen dissoziiert als der Antikörper SyD99-B8-Fc.

Im Hinblick auf eine Verwendung der Antikörper in bispezifischen Antikörpern kann eine geringere Affinität zum Effektorantigen von Vorteil sein. Eine geringe Affinität zum Effektorantigen CD3 führte bei einem EpCAM/CD3-bispezifischen Antikörper durch die bevorzugte Lokalisation im Tumorbereich zur Verbesserung der Aktivierung und Zytotoxizität der T-Zellen verglichen mit höher affinen Varianten des Antikörpers (Bortoletto *et al*, 2002).

Im letzten Schritt der biochemischen Charakterisierung der NKG2D-spezifischen Antikörper wurde das Aggregationsverhalten von SyD99-B5 und SyD99-B8 im scFv-Fc-Format mittels Größenausschlusschromatografie analysiert. Wie die zuvor charakterisierten CEA-spezifischen Antikörper zeigten auch die beiden NKG2D-spezifischen Antikörper nur eine geringe Tendenz zur Aggregation und bildeten maximal zu 5 % Dimere. Sowohl die CEA-spezifischen Antikörper, als auch die NKG2D-spezifischen Antikörper enthalten den humanen IgG1-Fc, weshalb auch im Fall der Effektorantigen-spezifischen Antikörper die Dimerbildung auf intermolekularen Interaktionen in den scFv-Fragmenten zurückgeführt werden kann.

### 6.3 Konstruktion und Charakterisierung bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format

Die Verwendung des scFv-Fc-scFv-Formats bietet die Möglichkeit scFv-Fragmente aus Antikörpergenbibliotheken direkt in ein tetravalentes bispezifisches Format ohne weitere Reformatierung des Antikörpers zu überführen. Mabry und Kollegen konstruierten bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format, welche zwei Zytokine erfolgreich neutralisieren (Mabry *et al.*, 2010b) oder die Angiogenese über zwei Signalwege dämpfen (Mabry *et al.*, 2010a).

Das verwendete Vektorsystem erlaubt darüber hinaus die einfache Überführung der Antikörperfragmente in das scFv-Fc-scFv-Format in einer zwei-schrittigen Klonierung. Bei den Vektoren handelt sich um Varianten des Vektors pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP (Jäger *et al.*, 2013), in welchem die Klonierungskassette im Rahmen der Masterarbeit von Sylvia Dietrich für die sekretorische Produktion von scFv-Fc-scFv-Antikörpern in HEK293-6E-Zellen angepasst wurde.

Als Zwischenschritt bei der Konstruktion bispezifischer Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format wurden zunächst die Effektorantigen-spezifischen scFv-Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 3' vom Fc-Teil unter Verwendung dreier unterschiedlicher Linkersequenzen kloniert, um Fc-scFv-Fusionsproteine zu erhalten. Im Vergleich zum scFv-Fc-Format wiesen alle Fc-scFv-Konstrukte durch die C-terminale Lokalisation des scFv-Fragments in der durchflusszytometrischen Analyse eine verringerte Antigenbindung auf. Pohl und Kollegen stellten ebenfalls eine Verringerung der Antigenbindung durch die C-terminale Fusion des scFv-Fragments an den Fc-Teil fest und führten dies auf eine verringerte Zugänglichkeit der Antigen-bindenden Domäne im Vergleich zum scFv-Fc-Format zurück (Pohl *et al.*, 2012).

Bei den Fc-scFv-Konstrukten auf Basis des Antikörpers SyD99-B5 ist zudem ein Einfluss des Linkers erkennbar. Der Antikörper SyD99-B5 wies bei der vorherigen Affinitätsbestimmung im scFv-Fc-Format eine schnelle Dissoziation vom Antigen auf. Vermutlich ermöglicht der GS-Linker (Linker 2) aufgrund seiner Flexibilität eine schnellere erneute Antigenbindung des dissoziierten Antikörpers als die beiden B-Zell-Rezeptor-basierten Linkervarianten (Linker 3 und 4). Bei den Fc-scFv-Konstrukten auf Basis des scFv-Fragments SyD99-B8 ist kein Einfluss der verwendeten Linkervariante auf die Antigenbindung festzustellen. Fennell *et al.* konstruierten bispezifische Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format, welche zwei

unterschiedliche immunmodulatorische Antigene binden. Für die Konstrukte wurden ebenfalls drei verschiedene Linker (ein GS-Linker, ein AT-Linker und ein Linker mit geladenen Aminosäureresten) verwendet, wobei kein Einfluss des Linkers auf die Funktion des Antikörpers festgestellt werden konnte. (Fennell *et al*, 2013)

Eine generelle Aussage über den Einfluss des Linkers auf die Antigenbindung kann nicht getroffen werden, da die Ergebnisse auf eine Abhängigkeit von der Kombination aus Antikörper und Linker hinweisen.

In der Analyse des Aggregationsverhaltens mittels Größenausschlusschromatografie wiesen alle Fc-scFv-Konstrukte im Vergleich zu den scFv-Fc-Antikörpern und unabhängig vom Typ des verwendeten Linkers keine verstärkte Tendenz zur Aggregation auf. Nach Klonierung des N-terminalen Tumorantigen-spezifischen scFv-Fragments in das Konstrukt und der Produktion der bispezifischen scFv-Fc-scFv-Antikörper zeigten diese eine deutlich verstärkte Tendenz zur Dimerisierung, wohingegen sich aber keine größeren Aggregate bildeten. Dabei ist davon auszugehen, dass die Dimere durch intermolekulare Interaktion zweier scFv-Fragmente gebildet werden. Die Faltung der Antikörperdomänen beginnt bereits co-translational im ER (Bergman & Kuehl, 1979) und verläuft je nach Domäne über verschiedene Zwischenstufen (Überblick in Feige *et al*, 2010). Daher kommt es wahrscheinlich schon während der sekretorischen Produktion zur Zusammenlagerung der scFv-Fragmente im ER durch die Zugänglichkeit hydrophober Bereiche oder Instabilität teilgefalteter Antikörper.

Die Aggregationsneigung der scFv-Fragmente kann durch Stabilisierung der Moleküle z.B. durch das Einfügen von Mutationen in den CDR- oder *Framework*-Regionen verringert werden (Überblick in Wörn & Plückthun, 2001). Einen weiteren Ansatz bietet die Stabilisierung des VH-VL-Interface durch Veränderung der Länge des Peptidlinkers (Arndt *et al*, 1998) oder das Einfügen von Disulfidbrücken (Brinkmann *et al*, 1993). Darüber hinaus kann die Selektion stabiler scFv-Fragmente aus Antikörpergenbibliotheken durch die Wahl der Selektionsbedingungen wie z.B. eine erhöhte Temperatur beeinflusst werden (Jung *et al*, 1999). Fennell und Kollegen nutzten die Mutagenese der CDR3-Regionen im scFv und die anschließende Selektion der Antikörpergenbibliotheken auf thermale Stabilität und Affinität zur Optimierung eines scFv-Antikörpers mit unzureichender Stabilität. Die Verwendung des stabileren scFv-Fragments ermöglichte die Produktion sehr stabiler und löslicher bifunktionaler Antikörper im scFv-Fc-scFv-Format. (Fennell *et al*, 2013)

Alternativ kann ein Wechsel des bispezifischen Formats zu einer Stabilisierung und Verringerung der Aggregation führen. Bispezifische Antikörper können in einer Vielzahl verschiedener Formate generiert werden (Überblick bei Brinkmann & Kontermann, 2017). Auf Basis der vorhandenen Antikörperkonstrukte und des verwendeten Klonierungskassettensystems bietet die C-terminale Fusion eines scFv-Fragments an ein IgG einen direkten und einfachen Ansatz für die Generierung bispezifischer Antikörper. Bispezifische Antikörper im IgG-scFv-Format wurden erstmals 1997 von Coloma und Morrison beschrieben, die ein Dansyl-spezifisches scFv-Fragment an die CH3-Domäne eines Anti-Dextran-Antikörpers fusionierten (Coloma & Morrison, 1997). Da die Optimierung des scFv-Fc-scFv-Formats nicht im Fokus jener Arbeit lag, wurden die bispezifischen Antikörper in diesem Format nicht weiter verwendet und alternativ zum IgG-scFv-Format gewechselt.

#### **6.4 Mono- und bispezifische Antikörperformate mit ADCC-optimiertem Fc-Teil**

Neben den vorhandenen CEA-spezifischen Antikörpern im scFv-Fc- und IgG-Format wurden auf Basis der scFv-Fragmente SUW59-A8 und SUW199-H2 Antikörper im scFv-Fc- und IgG-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil generiert, wobei ein Fc-Teil mit optimierter Proteinsequenz verwendet wurde (Lazar *et al*, 2006). Neben der Optimierung der Proteinsequenz kann alternativ auch eine Veränderung der Glykosylierung des Fc-Teils sowie die Kombination beider *Engineering*-Strategien zu einer Verstärkung der ADCC führen (Überblick in Kellner *et al*, 2014).

Basierend auf den monospezifischen Antikörpern im IgG-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil wurden bispezifische Antikörper im IgG-scFv-Format (Morrison-Format; Coloma & Morrison, 1997) durch Fusion eines NKG2D-spezifischen scFv-Fragments an die CH3-Domäne des IgGs erstellt. Um die Anzahl möglicher bispezifischer Konstrukte zu begrenzen, wurde hier nur der Antikörper SyD99-B8 verwendet, welcher zuvor eine gute Antigenbindung, geringe Tendenz zur Dimerisierung bzw. Aggregation und Unabhängigkeit der Antigenbindung vom Linker bei C-terminaler Fusion aufwies. Als Linker wurde nur die IgM-EMPD-basierte Variante (Linker 4) verwendet, da es sich um einen natürlich vorkommenden Linkersequenz handelt, welcher im Gegensatz zum IgG-EMPD-basierten

Linker (Linker 3), im bivalenten Antikörper keine Disulfidbrücke ausbildet und somit flexibler ist.

In der Größenausschlusschromatografie wiesen die mono- und bispezifischen Konstrukte mit ADCC-optimiertem Fc-Teil insgesamt eine geringe Tendenz zur Aggregation auf. Bei den bispezifischen IgG-scFv-Antikörpern war aber wie bei den scFv-Fc-scFv-Konstrukten ein Einfluss der Antikörperkombination auf das Aggregationsverhalten feststellbar.

In der funktionellen Analyse mittels ADCC-Assay mit peripheren Blutlymphozyten zweier Spender konnte für das bispezifische IgG-scFv-Konstrukt SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 mit ADCC-optimiertem Fc-Teil eine signifikante Erhöhung der Zelllyse der Zielzellen nachgewiesen werden. Da eine Erhöhung der Lyserate nur in Gegenwart des NKG2D-spezifischen Antikörpers SyD99-B8 feststellbar war und der ADCC-optimierte Fc-Teil allein nicht zu einer Erhöhung der Zelllyserate führte, kann davon ausgegangen werden, dass der NKG2D-spezifische Antikörper SyD99-B8 die Lyserate der Zielzellen positiv beeinflusst. Der hoch-affine HER2-spezifische Kontrollantikörper 4D5-8 ( $K_D = 0,1 \text{ nM}$  im ELISA-basierten Assay (Baselga, 2001; Carter *et al*, 1992) bzw.  $K_D = 0,5 \text{ nM}$  mittels SPR-Messung (Bostrom *et al*, 2011)) wies hingegen in allen getesteten mono- und bispezifischen Formaten mit ADCC-optimiertem Fc-Teil eine signifikante Lyse der Zielzellen auf.

Spender 2 zeigte bei allen verwendeten Antikörperformaten höhere Lyseraten, als Spender 1, was möglicherweise auf einen Polymorphismus im Fc $\gamma$ -Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) zurückgeführt werden kann, der signifikanten Einfluss auf die Affinität des Rezeptors zum Fc-Teil von Antikörpern besitzt. In der Membran-proximalen IgG-bindenden Domäne des Fc $\gamma$ -Rezeptors Fc $\gamma$ RIIIa können an Position 158 die Aminosäuren Valin (V) oder Phenylalanin (F) exprimiert sein. NK-Zellen von Spendern, welche homozygot für das Allel V158 sind, weisen eine stärkere IgG1- und IgG3-Bindung auf, im Vergleich zu Individuen, die homozygot für das Allel F158 sind. Heterozygote Spender zeigen eine mittlere IgG-Bindung. (Koene *et al*, 1997) In verschiedenen Studien konnte bereits der Einfluss des Fc $\gamma$ -Rezeptor-Polymorphismus auf die klinische Reaktion von Patienten gezeigt werden. Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten sowie Brustkrebspatienten des Allotyps Fc $\gamma$ RIIIa-V158 sprachen besser auf die Behandlung mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab bzw. dem HER2-spezifischen Antikörper Trastuzumab an, als Patienten des Allotyps

Fc $\gamma$ RIIIa-F158 (Weng & Levy, 2003; Musolino *et al*, 2008). Um den Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-F/V-Polymorphismus an Position 158 auf den ADCC-Assay genauer zu untersuchen, kann eine Typisierung der Spender z.B. mittels PCR unter Verwendung Allel-spezifischer Primer erfolgen (Leppers-van de Straat *et al*, 2000).

Die Titration der Antikörper im ADCC-Assay zeigte, dass vom IgG-scFv-Konstrukt mit dem niedrig-affinen CEA-spezifischen Antikörper SUW119-H2 Konzentrationen von mehr als 1 nM eingesetzt werden müssen, um eine effektive Erhöhung der Lyserate zu erreichen. Der hoch-affine HER2-spezifische Antikörper 4D5-8 wies hingegen schon bei Konzentrationen von 0,1 nM eine effektive Lyse auf. Neben der Affinität eines Antikörpers zum Antigen sowie strukturellen Eigenschaften des Antigens beeinflusst vermutlich auch die Lage des Epitops in Relation zur Zellmembran die Lyserate der Zielzellen. Der Antigenbindungsbereich (Epitop) von SUW119-H2 konnte auf einen distal zur Zellmembran gelegenen Bereich im Antigen CEA (N-Domäne und A1-Domäne) eingegrenzt werden. Der Antikörper 4D5-8 bindet hingegen in einem Membran-proximalen Bereich des Antigens HER2 (Cho *et al*, 2003). Cleary und Kollegen konnten im Zusammenhang mit CD20-, CD52- und CD137-spezifischen Antikörpern zeigen, dass eine Änderung der Position des Epitops in Relation zur Zellmembran Effektormechanismen beeinflusst. So führte die Membran-proximale Lage verstärkt zu ADCC und CDC, während durch eine distale Lage des Epitops ADCP begünstigt wurde. (Cleary *et al*, 2017)

Der Austausch des ADCC-optimierten Fc-Teils gegen den nicht-optimierten Fc-Teil zeigte deutlich die Spender-abhängige Verstärkung des zytotoxischen Effekts durch die Optimierung im Vergleich zum nicht-optimierten Fc-Teil. Der Unterschied zwischen den Spendern ist möglicherweise auf einen Polymorphismus an Position 158 im Fc $\gamma$ -Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) zurückzuführen, welcher die Bindungsaffinität zwischen dem Fc-Teil eines Antikörpers und dem Rezeptor stark beeinflusst. Im bispezifischen IgG-scFv-Konstrukt SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 konnte eine effektive Lyse der Zielzellen nur durch den ADCC-optimierten Fc-Teil erreicht werden, wohingegen die Lyserate durch den Austausch gegen den nicht-optimierten Fc-Teil auf das Hintergrundniveau sank. Da der niedrig-affine Antikörper SUW119-H2 in vorherigen Analysen in Verbindung mit dem ADCC-optimierten Fc-Teil im scFv-Fc- und IgG-Format zu keiner Erhöhung der Zelllyse führte, ist die Lyse der

Zielzellen vermutlich auf einen strukturellen oder funktionellen synergistischen Effekt durch die Kombination des ADCC-optimierten Fc-Teils und des NKG2D-spezifischen Antikörpers SyD99-B8 zurückzuführen. Diese Synergie führt wahrscheinlich zu einer Verstärkung der Zelllyse. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass zeitgleiches Targeting des Fc $\gamma$ -Rezeptors und NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen zu einer Verstärkung des zytolytischen Effekts im ADCC führt. In diesen Studien wurde der NKG2D-Rezeptor über einen NKG2D-Liganden gebunden, welcher auf der Oberfläche von Zielzellen exprimiert wurde (Deguine *et al*, 2012) oder mit einem CD20-spezifischen scFv-Fragment fusioniert eingesetzt (Kellner *et al*, 2016). Das Targeting des Fc $\gamma$ -Rezeptors erfolgte über einen zweiten Antikörper im IgG-Format (Deguine *et al*, 2012; Kellner *et al*, 2016). Ein verstärkter zytolytischer Effekt durch das duale Targeting der NK-Zellen scheint daher in Verbindung mit einer niedrigeren Affinität zum Tumorantigen vorteilhaft für eine effektive Lyse der Zielzellen zu sein.

Im Bezug auf die Affinität eines Tumor-spezifischen Antikörpers konnten Adams und Kollegen in Studien zur Bioverteilung von scFv-Antikörpern in soliden Tumoren im Mausmodell nachweisen, dass mittlere Affinitäten von  $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  M zu einer besseren Verteilung der Antikörper im Tumorgewebe führen verglichen mit höher affinen Varianten (Adams *et al*, 2001). Der EGFR-spezifische Antikörper Nimotuzumab (h-R3) wies in klinischen Studien eine gute Effektivität ohne schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Auf Basis der Daten entwickelten Crombet *et al*. ein mathematisches Modell zur Erklärung und schlussfolgerten, dass Antikörper mit mittlerer Affinität verglichen mit hochaffinen Antikörpern stärker in Tumoren (mit hoher EGFR-Expression) akkumulieren als in normalem Gewebe. (Crombet *et al*, 2004) Im Gegensatz zum hochaffinen EGFR-Antikörper Cetuximab benötigt Nimotuzumab die bivalente Antigenbindung für eine stabile Interaktion, wodurch der Antikörper selektiv an Zellen mit mittlerer und hoher Antigenexpression bindet. Auf normalen Zellen mit niedriger EGFR-Expression ist die monovalente Interaktion hingegen nur transient, wodurch gesundes Gewebe entscheidend geschont wird (Garrido *et al*, 2011). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, benötigt der CEA-spezifische Antikörper SUW119-H2 ebenfalls die bivalente Antigenbindung für eine stabile Interaktion, was eine präferierte Bindung auf CEA-überexprimierenden Tumorzellen vermuten lässt.



## 6.5 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten scFv-Fragmente, welche zuvor mittels Phagendisplay und *Panning* aus Antikörpergenbibliotheken selektiert wurden, durch Nutzung eines Kassetten-basierten Vektorsystems einfach und direkt in verschiedene mono- und bispezifische Antikörperformate überführt werden. Es wurden Antikörper im scFv-Fc-, IgG-, scFv-Fc-scFv- und IgG-scFv-Format z.T. mit ADCC-optimiertem Fc-Teil generiert und erfolgreich in Säugerzellen sekretorisch produziert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Antikörper hinsichtlich ihrer Antigenspezifität zum Tumor-assoziierten Antigen CEA und zum Effektorantigen NKG2D auf mit Antigen transfizierten Säugerzellen sowie Tumor- und NK-Zelllinien. Für den CEA-spezifischen Antikörper SUW119-H2 konnten darüber hinaus Bindungs-stabilisierende Aviditätseffekte im bivalenten scFv-Fc-Format nachgewiesen werden.

In der Analyse des Aggregationsverhaltens konnten große Unterschiede in der Aggregationstendenz der einzelnen Formate nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich ein deutlicher Einfluss der scFv-Fragmente im jeweiligen Konstrukt auf die Aggregation. Abbildung 6.1 zeigt eine Übersicht der Aggregationsneigung der einzelnen Formate in Form einer schematischen Darstellung.

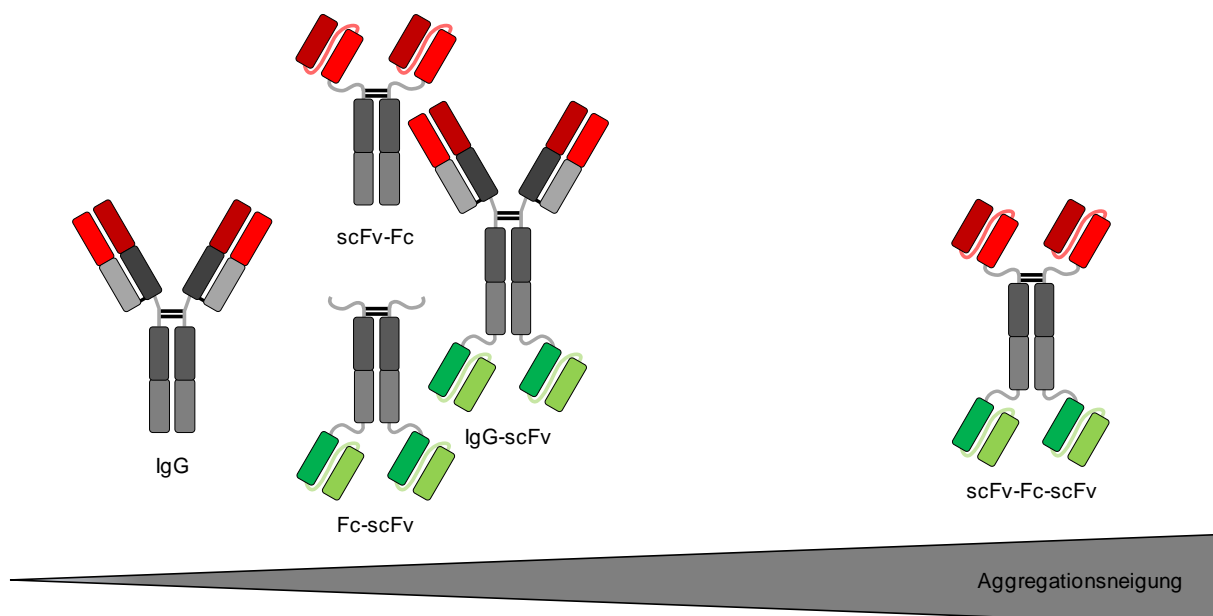


Abbildung 6.1 Unterschiedliche Aggregationsneigung der generierten Antikörperformate

Antikörper im IgG-Format wiesen nur eine sehr geringe Tendenz zur Aggregation auf, während das bispezifische scFv-Fc-scFv-Format die größte Neigung zur Aggregation zeigte.

Mittels ADCC-Assay konnte die Funktionalität verschiedener mono- und bispezifischer Konstrukte sowie die Verstärkung des lytischen Effekts durch Verwendung des ADCC-optimierten Fc-Teils nachgewiesen werden. In Verbindung mit dem niedrig-affinen CEA-spezifischen Antikörper SUW119-H2 konnte für das bispezifische IgG-scFv-Konstrukt ein potentiell verstärkender Effekt durch das duale Targeting von NK-Zellen über Fc-Teil und NKG2D-spezifischem Antikörper ermittelt werden.

## 6.6 Ausblick

Im Anschluss an die initiale funktionelle Charakterisierung des Antikörpers SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 sollte eine umfangreichere Analyse der funktionellen Eigenschaften des bispezifischen Antikörpers erfolgen. Hierzu müssen weitere ADCC-Analysen mit peripheren Blutlymphozyten sowie gereinigten NK-Zellen verschiedener Spender mit paralleler Typisierung hinsichtlich des Fc $\gamma$ RIIIa-F/V-Polymorphismus an Position 158 erfolgen, um den Einfluss des Polymorphismus auf die Effektivität des Antikörpers zu bestimmen. Zur genaueren Untersuchung des potentiell strukturellen oder funktionellen synergistischen Effekts zwischen dem NKG2D-spezifischen Antikörper und dem Fc-Teil sollten Analysen mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität und Affinität erfolgen, sowie die Nutzung von NK-92-Zellen als Effektorzellen. Durch Verwendung verschiedener Targetzelllinien mit unterschiedlichem CEA-Expressionslevel sollte die Abhängigkeit der Bindung und Effektivität der Zelllyse von der CEA-Expression untersucht werden. Des Weiteren könnte der Einfluss von löslichem CEA auf die Zelllyse im ADCC-Assay durch Kompetition untersucht werden. Die Charakterisierung der Antikörper sollte zudem ein genaues Epitopmapping beinhalten.

In weiteren Analysen könnte ein möglicher Effekt der CEA-spezifischen Antikörper auf homo- und heterophile CEA-Interaktionen untersucht werden oder funktionelle Analysen im Maus-Xenograft-Modell durchgeführt werden.

Parallel zur eingehenden Charakterisierung des Antikörpers SUW119-H2-IgG\*-SyD99-B8 könnte eine Reifung der initial selektierten CEA- und NKG2D-spezifischen scFv-Fragmente hinsichtlich ihrer Stabilität und/oder Affinität erfolgen, um eine Verringerung der Aggregationsneigung der Antikörper zu erreichen. Anschließend könnten die Antikörper erneut im scFv-Fc-scFv-Format untersucht werden und ein Vergleich mit dem IgG-scFv-Format erfolgen.



## 7 Literatur

- Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD & Weiner LM (2001) High Affinity Restricts the Localization and Tumor Penetration of Single-Chain Fv Antibody Molecules. *Cancer Res.* **61**: 4750–4755
- Alderson KL & Sondel PM (2011) Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 379123–379123
- Anderson HA, Hiltbold EM & Roche PA (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* **1**: 156
- Arlotta KJ & Owen SC (2019) Antibody and antibody derivatives as cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **0**: e1556
- Arndt KM, Müller KM & Plückthun A (1998) Factors Influencing the Dimer to Monomer Transition of an Antibody Single-Chain Fv Fragment. *Biochemistry* **37**: 12918–12926
- Asgharpour A, Cheng J & Bickston SJ (2013) Adalimumab treatment in Crohn's disease: an overview of long-term efficacy and safety in light of the EXTEND trial. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **6**: 153–160
- Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M & Reyburn HT (2010) Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA\*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Res.* **70**: 481–489
- Bacac M, Fauti T, Sam J, Colombetti S, Weinzierl T, Ouaret D, Bodmer W, Lehmann S, Hofer T, Hosse RJ, Moessner E, Ast O, Bruenker P, Grau-Richards S, Schaller T, Seidl A, Gerdes C, Perro M, Nicolini V, Steinhoff N, et al (2016) A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **22**: 3286–3297

- Bannas P, Hambach J & Koch-Nolte F (2017) Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* **8**: Article 1603
- Baselga J (2001) Phase I and II clinical trials of trastuzumab. *Ann. Oncol.* **12**: S49–S55
- Baselga J, Perez EA, Pienkowski T & Bell R (2006) Adjuvant Trastuzumab: A Milestone in the Treatment of HER-2-Positive Early Breast Cancer. *The Oncologist* **11**: 4–12
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL & Spies T (1999) Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* **285**: 727–729
- Beauchemin N & Arabzadeh A (2013) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **32**: 643–671
- Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarström S, Holmes KV & et al. (1999) Redefined Nomenclature for Members of the Carcinoembryonic Antigen Family. *Exp. Cell Res.* **252**: 243–249
- Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shiota K & Stanners CP (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**: 327–334
- Bepler G, Jaques G, Koehler A, Gropp C & Havemann K (1987) Markers and characteristics of human SCLC cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **113**: 253–259
- Bepler G, Koehler A, Kiefer P, Havemann K, Beisenherz K, Jaques G, Gropp C & Haeder M (1988) Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* **37**: 158–171
- Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard E-M, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J & Palucka AK (2000) Cross-Priming of Naive Cd8 T Cells against Melanoma Antigens Using Dendritic Cells Loaded with Killed Allogeneic Melanoma Cells. *J. Exp. Med.* **192**: 1535–1544

- Bergman LW & Kuehl WM (1979) Formation of an Intrachain Disulfide Bond on Nascent Immunoglobulin Light Chains. *J. Biol. Chem.* **254**: 9
- Bibeau F, Lopez-Crapez E, Fiore FD, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frébourg T, Michel P, Sabourin J-C & Boissière-Michot F (2009) Impact of FcγRIIa-FcγRIIIa Polymorphisms and KRAS Mutations on the Clinical Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab Plus Irinotecan. *J. Clin. Oncol.* **27**: 1122–1129
- Bispecific Antibodies: FDA Drafts Guidance for Developers (2019) Available at: <https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2019/4/bispecific-antibodies-fda-drafts-guidance-for-dev> [Accessed April 23, 2019]
- Blanco B, Holliger P & Álvarez-Vallina L (2002) Autocrine costimulation: Tumor-specific CD28-mediated costimulation of T cells by in situ production of a bifunctional B7–anti-CEA diabody fusion protein. *Cancer Gene Ther.* **9**: 275–281
- Bortoletto N, Scotet E, Myamoto Y, D’Oro U & Lanzavecchia A (2002) Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells. *Eur. J. Immunol.* **32**: 3102–3107
- Bostrom J, Haber L, Koenig P, Kelley RF & Fuh G (2011) High Affinity Antigen Recognition of the Dual Specific Variants of Herceptin Is Entropy-Driven in Spite of Structural Plasticity. *PLOS ONE* **6**: e17887
- Boulianne GL, Hozumi N & Shulman MJ (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**: 643–646
- Brennan M, Davison PF & Paulus H (1985) Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science* **229**: 81–83
- Brinkmann U & Kontermann RE (2017) The making of bispecific antibodies. *mAbs* **9**: 182–212
- Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B & Pastan I (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7538–7542

- van Brummelen E, Lassen U, Melero I, Tabernero J, Homicsko K, Angevin E, Teichgräber V, Jukofsky L, Rossmann E, Babitzki G, Patricia Silva A, Canamero M, Boetsch C, Evers S, Charo J & Argiles G (2017) 1181P Pharmacokinetics (PK) and Pharmacodynamics (PD) of cergutuzumab amunaleukin (CA), a carcinoembryonic antigen (CEA)-targeted interleukin 2 variant (IL2v) with abolished binding to CD25. *Ann. Oncol.* **28**: 418–419
- Buchbinder EI & McDermott DF (2015) Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Blockade in Melanoma. *Clin. Ther.* **37**: 755–763
- Buick RN, Pullano R & Trent JM (1985) Comparative Properties of Five Human Ovarian Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res.* **45**: 3668–3676
- Byrd JC, Pagel JM, Awan FT, Forero A, Flinn IW, Deauna-Limayo DP, Spurgeon SE, Andritsos LA, Gopal AK, Leonard JP, Eisenfeld AJ, Bannink JE, Stromatt SC & Furman RR (2014) A phase 1 study evaluating the safety and tolerability of otlertuzumab, an anti-CD37 mono-specific ADAPTIR therapeutic protein in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**: 1302–1308
- Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* **112**: 461–469
- Call ME & Wucherpfennig KW (2007) Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 841–850
- Camacho-Leal P & Stanners CP (2008) The human carcinoembryonic antigen (CEA) GPI anchor mediates anoikis inhibition by inactivation of the intrinsic death pathway. *Oncogene* **27**: 1545–1553
- Campbell JA, Trossman DS, Yokoyama WM & Carayannopoulos LN (2007) Zoonotic orthopoxviruses encode a high-affinity antagonist of NKG2D. *J. Exp. Med.* **204**: 1311–1317
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME & Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4285–4289



- Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P & Watier H (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* **99**: 754–758
- Cartron G, Watier H, Golay J & Solal-Celigny P (2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* **104**: 2635–2642
- Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L & Santoni A (2007) Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* **110**: 606–615
- Chames P, Regenmortel MV, Weiss E & Baty D (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**: 220–233
- Charbonneau J & Stanners CP (1999) Role of carbohydrate structures in CEA-mediated intercellular adhesion. *Cell Adhes. Commun.* **7**: 233–244
- Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay J-Y, Ferrari S, Kroep J, Grimer R, Reichardt P, Rutkowski P, Schuetze S, Skubitz K, Staddon A, Thomas D, Qian Y & Jacobs I (2013) Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **14**: 901–908
- Chen T, Grunert F, Medina-Marino A & Gotschlich EC (1997) Several Carcinoembryonic Antigens (CD66) Serve as Receptors for Gonococcal Opacity Proteins. *J. Exp. Med.* **185**: 1557–1564
- Childs RW & Carlsten M (2015) Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**: 487–498
- Cho H-S, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW & Leahy DJ (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**: 756–760

- Chua HL, Serov Y & Brahmi Z (2004) Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum. Immunol.* **65**: 317–327
- Clark MR (1997) IgG effector mechanisms. *Chem. Immunol.* **65**: 88–110
- Cleary KLS, Chan HTC, James S, Glennie MJ & Cragg MS (2017) Antibody distance from the cell membrane regulates antibody effector mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**: 3999–4011
- Coiffier B (2007) Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* **26**: 3603–3613
- Coloma MJ & Morrison SL (1997) Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat. Biotechnol.* **15**: 159
- Cooper MA, Fehniger TA & Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**: 633–640
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881–10890
- Courtenay-Luck NS, Epenetos AA, Moore R, Larche M, Pectasides D, Dhokia B & Ritter MA (1986) Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. *Cancer Res.* **46**: 6489–6493
- Crombet T, Osorio M, Cruz T, Roca C, del Castillo R, Mon R, Iznaga-Escobar N, Figueredo R, Koropatnick J, Renginfo E, Fernández E, Álvarez D, Torres O, Ramos M, Leonard I, Pérez R & Lage A (2004) Use of the Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody h-R3 in Combination With Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **22**: 1646–1654
- Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S & Christiansen C (2009) Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **361**: 756–765

- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H & Thibault G (2004) Rituximab-Dependent Cytotoxicity by Natural Killer Cells Influence of FCGR3A Polymorphism on the Concentration-Effect Relationship. *Cancer Res.* **64**: 4664–4669
- Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T & Bukowski JF (2001) MICA Engagement by Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells Enhances Their Antigen-Dependent Effector Function. *Immunity* **15**: 83–93
- De Vries E, Heinemann V, Fiedler WM, Seufferlein T, Verheul HMW, De Groot DJ, von Einem JC, Ren S, Cheung K, Rasmussen E, Volkland J, Means GD, Kratzer A, Wolf A & Stienen S (2015) Phase I study of AMG 211/MEDI-565 administered as continuous intravenous infusion for relapsed/refractory gastrointestinal (GI) adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **33**: TPS3097
- Deguine J, Breart B, Lemaître F & Bousso P (2012) Cutting Edge: Tumor-Targeting Antibodies Enhance NKG2D-Mediated NK Cell Cytotoxicity by Stabilizing NK Cell–Tumor Cell Interactions. *J. Immunol.* **189**: 5493–5497
- Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B & Dhodapkar MV (2002) Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-specific Killer T Cells by Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **195**: 125–133
- Dorvillius M, Garambois V, Pourquier D, Gutowski M, Rouanet P, Mani J-C, Pugnière M, Hynes NE & Pégrin A (2002) Targeting of Human Breast Cancer by a Bispecific Antibody Directed against Two Tumour-Associated Antigens: ErbB-2 and Carcinoembryonic Antigen. *Tumor Biol.* **23**: 337–347
- Dotan E, Cohen SJ, Starodub AN, Lieu CH, Messersmith WA, Simpson PS, Guarino MJ, Marshall JL, Goldberg RM, Hecht JR, Wegener WA, Sharkey RM, Govindan SV, Goldenberg DM & Berlin JD (2017) Phase I/II Trial of Labetuzumab Govitecan (Anti-CEACAM5/SN-38 Antibody-Drug Conjugate) in Patients With Refractory or Relapsing Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**: 3338–3346

- Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ & Trujillo JM (1976) Establishment of a Human Carcinoembryonic Antigen-producing Colon Adenocarcinoma Cell Line. *Cancer Res.* **36**: 467–475
- Drewinko B, Yang LY, Leibovitz A, Barlogie B, Lutz D, Jansson B, Stragand JJ & Trujillo JM (1984) Cellular Discriminants for a Biological Classification of Human Colon Carcinoma. *Cancer Res.* **44**: 4241–4253
- Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products (2019) Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> [Accessed April 23, 2019]
- Dübel S, Stoevesandt O, Taussig MJ & Hust M (2010) Generating recombinant antibodies to the complete human proteome. *Trends Biotechnol.* **28**: 333–339
- Duffy MJ (2001) Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clin. Chem.* **47**: 624–630
- Durchführungsbeschluss der Europäischen Kommission, C(2017) 3947 final, 2017 Available at: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170602138036/dec\\_138036\\_de.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170602138036/dec_138036_de.pdf) [Accessed April 19, 2019]
- Durocher Y, Perret S & Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* **30**: e9
- Elgundi Z, Reslan M, Cruz E, Sifniotis V & Kayser V (2017) The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **122**: 2–19
- Fan G, Wang Z, Hao M & Li J (2015) Bispecific antibodies and their applications. *J. Hematol. Oncol.* **8**: 130
- Faria SC, Sagebiel T, Patnana M, Cox V, Viswanathan C, Lall C, Qayyum A & Bhosale PR (2019) Tumor markers: myths and facts unfolded. *Abdom. Radiol.* **44**: 1575–1600

- FDA: BLA 125019 Suppl-227; ZEVALIN, labeling information Available at: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/125019s227lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125019s227lbl.pdf) [Accessed April 16, 2019]
- FDA: BLA 125427 Suppl-104; KADCYLA, labeling information Available at: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/125427s104lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125427s104lbl.pdf) [Accessed April 16, 2019]
- Feige MJ, Hendershot LM & Buchner J (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 189–198
- Fennell BJ, McDonnell B, Tam ASP, Chang L, Steven J, Broadbent ID, Gao H, Kieras E, Alley J, Luxenberg D, Edmonds J, Fitz LJ, Miao W, Whitters MJ, Medley QG, Guo YJ, Darmanin-Sheehan A, Autin B, Shúilleabháin DN, Cummins E, et al (2013) CDR-restricted engineering of native human scFvs creates highly stable and soluble bifunctional antibodies for subcutaneous delivery. *mAbs* **5**: 882–895
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A & Münz C (2004) The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J. Immunol.* **172**: 1455–1462
- Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Agüera-González S, Skepper JN, Reyburn HT & Valés-Gómez M (2010) Differential Mechanisms of Shedding of the Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D Ligands. *J. Biol. Chem.* **285**: 8543–8551
- Fogh J (1975) Human Tumor Cells in Vitro Plenum Press
- Frazao A, Rethacker L, Messaoudene M, Avril M-F, Toubert A, Dulphy N & Caignard A (2019) NKG2D/NKG2-Ligand Pathway Offers New Opportunities in Cancer Treatment. *Front. Immunol.* **10**: Article 661
- Gaetano ND, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M & Golay J (2003) Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *J. Immunol.* **171**: 1581–1587

- Gangopadhyay A, Bajenova O, Kelly TM & Thomas P (1996) Carcinoembryonic Antigen Induces Cytokine Expression in Kupffer Cells: Implications for Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **56**: 4805–4810
- Garber K (2014) Bispecific antibodies rise again. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**: 799–801
- Garcia M, Seigner C, Bastid C, Choux R, Payan MJ & Reggio H (1991) Carcinoembryonic Antigen Has a Different Molecular Weight in Normal Colon and in Cancer Cells due to N-Glycosylation Differences. *Cancer Res.* **51**: 5679–5686
- Garrido G, Tikhomirov IA, Rabasa A, Yang E, Gracia E, Iznaga N, Fernández LE, Crombet T, Kerbel RS & Pérez R (2011) Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: A contribution to explain antibody clinical profile. *Cancer Biol. Ther.* **11**: 373–382
- Garrity D, Call ME, Feng J & Wucherpfennig KW (2005) The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 7641–7646
- Geiger TL & Sun JC (2016) Development and Maturation of Natural Killer Cells. *Curr. Opin. Immunol.* **39**: 82–89
- Genentech, Inc. (2015) Herceptin Prescribing Information. Available at: [http://www.gene.com/download/pdf/herceptin\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/herceptin_prescribing.pdf) [Accessed May 30, 2015]
- Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Da Prada G, Zambelli A & Costa A (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**: 5650–5655
- Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, Sainson R, Jovanovic J, Tighe NJ, Bannister D, Bamber L, Valge-Archer V & Wilkinson RW (2017) MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br. J. Cancer* **116**: 1208–1217

- Gisbergen KPJM van, Aarnoudse CA, Meijer GA, Geijtenbeek TBH & Kooyk Y van (2005) Dendritic Cells Recognize Tumor-Specific Glycosylation of Carcinoembryonic Antigen on Colorectal Cancer Cells through Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. *Cancer Res.* **65**: 5935–5944
- Glennie MJ & Johnson PWM (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunol. Today* **21**: 403–410
- Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E & Francis F (1998) The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* **48**: 163–173
- Global Bispecific Antibody Market, Drug Sales & Clinical Pipeline Insight 2025 (2019) Available at: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4744781/global-bispecific-antibody-market-drug-sales-and> [Accessed April 23, 2019]
- Golay J, Manganini M, Rambaldi A & Introna M (2004) Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells. *Haematologica* **89**: 1476–1483
- Gold P & Freedman SO (1965) Specific Carcinoembryonic Antigens Of The Human Digestive System. *J. Exp. Med.* **122**: 467–481
- Goldenberg DM, Rossi EA, Sharkey RM, McBride WJ & Chang C-H (2007) Multifunctional Antibodies by the Dock-and-Lock Method for Improved Cancer Imaging and Therapy by Pretargeting. *J. Nucl. Med.* **49**: 158–163
- Goldstein MJ & Mitchell EP (2005) Carcinoembryonic Antigen in the Staging and Follow-up of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Invest.* **23**: 338–351
- Gong JH, Maki G & Klingemann HG (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* **8**: 652–658
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M & Spies T (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 12445–12450

- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR & Spies T (2001) Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* **2**: 255–260
- Groh V, Wu J, Yee C & Spies T (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**: 734–738
- Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T & Brenner MB (2002) Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. *J. Exp. Med.* **195**: 625–636
- Hammarström S (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* **9**: 67–81
- Harding FA, Stickler MM, Razo J & DuBridge R (2010) The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs* **2**: 256–265
- Hatakeyama K, Wakabayashi-Nakao K, Ohshima K, Sakura N, Yamaguchi K & Mochizuki T (2013) Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. *BMC Res. Notes* **6**: 381
- Hefta SA, Hefta LJ, Lee TD, Paxton RJ & Shively JE (1988) Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 4648–4652
- Herberman RB, Nunn ME & Lavrin DH (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* **16**: 216–229
- Holliger P & Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1126–1136
- Holliger P, Prospero T & Winter G (1993) ‘Diabodies’: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 6444–6448



- Hood L, Kronenberg M & Hunkapiller T (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* **40**: 225–229
- Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1105–1116
- Hornig T, Bezbradica JS & Medzhitov R (2007) NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat. Immunol.* **8**: 1345–1352
- Hornick CL & Karush F (1972) Antibody affinity—III the role of multivalence. *Immunochemistry* **9**: 325–340
- Houchins JP, Yabe T, McSherry C & Bach FH (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **173**: 1017–1020
- Hudson PJ (1999) Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 548–557
- Huehls AM, Coupet TA & Sentman CL (2015) Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* **93**: 290–296
- Human ORFeome V5.1 Available at: <http://horfdb.dfci.harvard.edu/hv5/index.php> [Accessed June 8, 2015]
- Hust M, Meyer T, Voedisch B, Rülker T, Thie H, El-Ghezel A, Kirsch MI, Schütte M, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T & Dübel S (2011) A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J. Biotechnol.* **152**: 159–170
- Ilantzis C, Demarte L, Screaton RA & Stanners CP (2002) Deregulated Expression of the Human Tumor Marker CEA and CEA Family Member CEACAM6 Disrupts Tissue Architecture and Blocks Colonocyte Differentiation. *Neoplasia* **4**: 151–163
- Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A & Schirrmann T (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**: 52

- Jain M, Kamal N & Batra SK (2007) Engineering antibodies for clinical applications. *Trends Biotechnol.* **25**: 307–316
- Jakobovits A (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 561–566
- Jenkins N, Murphy L & Tyther R (2008) Post-translational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Mol. Biotechnol.* **39**: 113–118
- Jessup JM, Laguine L, Lin S, Samara R, Aufman K, Battle P, Frantz M, Edmiston KH & Thomas P (2004) Carcinoembryonic antigen induction of IL-10 and IL-6 inhibits hepatic ischemic/reperfusion injury to colorectal carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **111**: 332–337
- Johnson S, Burke S, Huang L, Gorlatov S, Li H, Wang W, Zhang W, Tuailon N, Rainey J, Barat B, Yang Y, Jin L, Ciccarone V, Moore PA, Koenig S & Bonvini E (2010) Effector Cell Recruitment with Novel Fv-based Dual-affinity Re-targeting Protein Leads to Potent Tumor Cytolysis and in Vivo B-cell Depletion. *J. Mol. Biol.* **399**: 436–449
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS & Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**: 522–525
- Jothy S, Yuan SY & Shirota K (1993) Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. In situ hybridization study and implication for a new in vivo functional model. *Am. J. Pathol.* **143**: 250–257
- Jung S, Honegger A & Plückthun A (1999) Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* **294**: 163–180
- Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W & Weinstein JN (1992) Micropharmacology of Monoclonal Antibodies in Solid Tumors: Direct Experimental Evidence for a Binding Site Barrier. *Cancer Research* **52**: 5144–5153

- Kaiser BK, Yim D, Chow I-T, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V & Spies T (2007) Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* **447**: 482–486
- Kakkar AK & Balakrishnan S (2015) Obinutuzumab for chronic lymphocytic leukemia: promise of the first treatment approved with breakthrough therapy designation. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **21**: 358–363
- Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberger R, Schäuble C, Krupar R, Kamp A, Sunami K, Eisenried A, Hennenberg M, Grunert F, Bress A, Battaglia S, Schrewe H, Knipper M, Schneider MR & Zimmermann W (2012) Loss of Mammal-specific Tectorial Membrane Component Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 16 (CEACAM16) Leads to Hearing Impairment at Low and High Frequencies. *J. Biol. Chem.* **287**: 21584–21598
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ & Sharpe AH (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**: 677–704
- Kellner C, Derer S, Valerius T & Peipp M (2014) Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods* **65**: 105–113
- Kellner C, Günther A, Humpe A, Repp R, Klausz K, Derer S, Valerius T, Ritgen M, Brüggemann M, Winkel JG van de, Parren PW, Kneba M, Gramatzki M & Peipp M (2016) Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *OncoImmunology* **5**: e1058459
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S & Brenner HJ (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer* **15**: 659–670
- Khan WN & Hammarström S (1991) Biosynthesis of carcinoembryonic antigen (CEA) gene family members expressed in human tumor cell lines: evidence for cleavage of the glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor by GPI-PLC and GPI-PLD. *Biochem. Int.* **25**: 723–731

- Kiessling R, Klein E & Wigzell H (1975) „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**: 112–117
- Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S & Biray-Avci C (2018) Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol. Biol. Rep.* **45**: 2935–2940
- Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Schuhmacher J, Cochlovius B, Von der Lieth C-W, Matys ER & Little M (1999) Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics<sup>11</sup> Edited by J. Karn. *J. Mol. Biol.* **293**: 41–56
- Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG, Freimoser-Grundschober A, Nayak T, Vugts DJ, Dunn C, Bolijn M, Benz J, Stihle M, Lang S, Roemmele M, Hofer T, Puijenbroek E van, Wittig D, Moser S, Ast O, Brünker P, Gorr IH, Neumann S, et al (2017) Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *OncoImmunology* **6**: e1277306
- Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee H-G, Steinle A, Krusch M & Salih HR (2008) Interaction of Monocytes with NK Cells upon Toll-Like Receptor-Induced Expression of the NKG2D Ligand MICA. *J. Immunol.* **181**: 6711–6719
- Ko B-K, Choi S, Cui LG, Lee Y-H, Hwang I-S, Kim K-T, Shim H & Lee J-S (2015) Affinity Maturation of Monoclonal Antibody 1E11 by Targeted Randomization in CDR3 Regions Optimizes Therapeutic Antibody Targeting of HER2-Positive Gastric Cancer. *PLOS ONE* **10**: e0134600
- Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Satta T, Hasegawa T, Oikawa S, Kondoh K, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I & Takagi H (1993) Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br. J. Cancer* **68**: 130
- Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, Borne AEGK von dem & Haas M de (1997) FcγRIIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG by Natural Killer Cell FcγRIIIa, Independently of the FcγRIIIa-48L/R/H Phenotype. *Blood* **90**: 1109–1114

- Köhler G & Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495–497
- Konishi F (2002) CEA Doubling Time and CEA Half-life in the Prediction of Recurrences after Colorectal Cancer Surgery. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **32**: 41–42
- Kontermann RE (2009) Strategies to Extend Plasma Half-Lives of Recombinant Antibodies. *BioDrugs* **23**: 93–109
- Kontermann RE (2011) Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 868–876
- Kontermann RE & Brinkmann U (2015) Bispecific antibodies. *Drug Discov. Today* **20**: 838–847
- Kuespert K, Pils S & Hauck CR (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 565–571
- Kumar S, Singh SK, Wang X, Rup B & Gill D (2011) Coupling of Aggregation and Immunogenicity in Biotherapeutics: T- and B-Cell Immune Epitopes May Contain Aggregation-Prone Regions. *Pharm. Res.* **28**: 949
- Lahlou A, Blanchet B, Carvalho M, Paul M & Astier A (2009) Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab. *Ann. Pharm. Fr.* **67**: 340–352
- Lamesch P, Li N, Milstein S, Fan C, Hao T, Szabo G, Hu Z, Venkatesan K, Bethel G, Martin P, Rogers J, Lawlor S, McLaren S, Dricot A, Borick H, Cusick ME, Vandenhaute J, Dunham I, Hill DE & Vidal M (2007) hORFeome v3.1 : A resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics* **89**: 307–315
- Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**: 495–502
- Lanier LL (2015) NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol. Res.* **3**: 575–582

- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR & Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **136**: 4480–4486
- Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ & Dahiyat BI (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 4005–4010
- Lazarova M & Steinle A (2019) The NKG2D axis: an emerging target in cancer immunotherapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **23**: 281–294
- Lee CS, Ashton-Key M, Cogliatti S, Rondeau S, Schmitz S-FH, Ghielmini M, Cragg MS & Johnson P (2015) Expression of the inhibitory Fc gamma receptor IIB (FCGR2B, CD32B) on follicular lymphoma cells lowers the response rate to rituximab monotherapy (SAKK 35/98). *Br. J. Haematol.* **168**: 145–148
- Lee J-C, Lee K-M, Kim D-W & Heo DS (2004) Elevated TGF- $\beta$ 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J. Immunol.* **172**: 7335–7340
- Lefranc M-P, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles A, Paysan-Lafosse T, Hadi-Saljoqi S, Sasorith S, Lefranc G & Kossida S (2015) IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res.* **43**: D413–D422
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC & Mabry ND (1976) Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res.* **36**: 4562–4569
- Leppers-van de Straat FGJ, van der Pol W-L, Jansen MD, Sugita N, Yoshie H, Kobayashi T & van de Winkel JGJ (2000) A novel PCR-based method for direct Fc $\gamma$  receptor IIIa (CD16) allotyping. *J. Immunol. Methods* **242**: 127–132

- Leusch H-G, Hefta SA, Drzeniek Z, Hummel K, Markos-Pusztai Z & Wagener C (1990) Escherichia coli of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett.* **261**: 405–409
- Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, Guntas G, Leaver-Fay A, Smith EM, Ho C, Hansen-Estruch C, Chamberlain AK, Truhlar SM, Conner EM, Atwell S, Kuhlman B & Demarest SJ (2014) Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* **32**: 191–198
- Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T & Strong RK (2001) Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.* **2**: 443
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJW, Kussie P & Ferguson KM (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**: 301–311
- Li W, Prabakaran P, Chen W, Zhu Z, Feng Y & Dimitrov DS (2016) Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure. *Antibodies* **5**: 19
- Li Y, Cao H, Jiao Z, Pakala SB, Sirigiri DNR, Li W, Kumar R & Mishra L (2010) Carcinoembryonic Antigen Interacts with TGF- $\beta$  Receptor and Inhibits TGF- $\beta$  Signaling in Colorectal Cancers. *Cancer Res.* **70**: 8159–8168
- Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HTC, Beers SA, French RR, Cox KL, Davies AJ, Potter KN, Mockridge CI, Oscier DG, Johnson PWM, Cragg MS & Glennie MJ (2011) Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* **118**: 2530–2540
- Linke R, Klein A & Seimetz D (2010) Catumaxomab. *mAbs* **2**: 129–136
- Lisowska E (2002) The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**: 445–455
- Ljunggren H-G & Kärre K (1990) In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**: 237–244

- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF & Bast RC (2006) ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**: 5313–5327
- Lonberg N (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1117–1125
- Lowe D, Dudgeon K, Rouet R, Schofield P, Jermutus L & Christ D (2011) Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* pp 41–61.
- Mabry R, Gilbertson DG, Frank A, Vu T, Ardourel D, Ostrander C, Stevens BL, Julien SH, Franke S, Meengs B, Brody J, Presnell S, Hamacher NB, Lantry M, Wolf AC, Bukowski T, Rosler R, Yen C, Anderson-Haley M, Brasel K, et al (2010a) A dual-targeting PDGFR $\beta$ /VEGF-A molecule assembled from stable antibody fragments demonstrates anti-angiogenic activity in vitro and in vivo. *mAbs* **2**: 20–34
- Mabry R, Lewis KE, Moore M, McKernan PA, Bukowski TR, Bontadelli K, Brender T, Okada S, Lum K, West J, Kuijper JL, Ardourel D, Franke S, Lockwood L, Vu T, Frank A, Appleby MW, Wolf A, Reardon B, Hamacher NB, et al (2010b) Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**: 115–127
- Macrae FA (2019) Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors - UpToDate. Available at: <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors/print> [Accessed April 30, 2019]
- Majuri M-L, Hakkarainen M, Paavonen T & Renkonen R (1994) Carcinoembryonic antigen is expressed on endothelial cells. *APMIS* **102**: 432–438
- Maki G, Klingemann HG, Martinson JA & Tam YK (2001) Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**: 369–383
- Mandal A & Viswanathan C (2015) Natural killer cells: In health and disease. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **8**: 47–55



- Manning MC, Matsuura JE, Kendrick BS, Meyer JD, Dormish JJ, Vrkljan M, Ruth JR, Carpenter JF & Sheftert E (1995) Approaches for increasing the solution stability of proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **48**: 506–512
- Martins CD, Kramer-Marek G & Oyen WJG (2018) Radioimmunotherapy for delivery of cytotoxic radioisotopes: current status and challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* **15**: 185–196
- Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG & Carter P (1998) An efficient route to human bispecific IgG. *Nat. Biotechnol.* **16**: 677–681
- Milenic DE, Garmestani K, Brady ED, Albert PS, Ma D, Abdulla A & Brechbiel MW (2004) Targeting of HER2 Antigen for the Treatment of Disseminated Peritoneal Disease. *Clin. Cancer Res.* **10**: 7834–7841
- Milstein C & Cuello AC (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* **305**: 537–540
- Mishra AP, Chandra S, Tiwari R, Srivastava A & Tiwari G (2018) Therapeutic Potential of Prodrugs Towards Targeted Drug Delivery. *Open Med. Chem. J.* **12**: 111–123
- Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA, Fainboim L & Zwirner NW (2002) Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J. Leukoc. Biol.* **71**: 791–797
- Mollova S, Retter I & Müller W (2007) Visualising the immune repertoire. *BMC Syst. Biol.* **1**: P30
- Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017) – ACTIP website Available at: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/> [Accessed April 16, 2019]
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R & Moretta A (2002) Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **32**: 1205–1211

- Moretta L & Moretta A (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* **23**: 255–259
- Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S & Bardelli A (2005) Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* **6**: 279–286
- Morris EC, Bendle GM & Stauss HJ (2003) Prospects for immunotherapy of malignant disease. *Clin. Exp. Immunol.* **131**: 1–7
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA & Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 6851–6855
- Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO & Topp EM (2016) Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J. Pharm. Sci.* **105**: 417–430
- Mrozek E, Anderson P & Caligiuri MA (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**: 2632–2640
- Mullard A (2014) FDA approves first bispecific. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**: 7
- Mullard A (2018) 2017 FDA drug approvals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**: 81–85
- Müller KM, Arndt KM & Plückthun A (1998) Model and Simulation of Multivalent Binding to Fixed Ligands. *Anal. Biochem.* **261**: 149–158
- Müller-Brüsselbach S, Korn T, Völkel T, Müller R & Kontermann R (1999) Enzyme recruitment and tumor cell killing in vitro by a secreted bispecific single-chain diabody. *Tumor Target.* **4**: 115–123
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273

- Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM & Ardizzoni A (2008) Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms and Clinical Efficacy of Trastuzumab-Based Therapy in Patients With HER-2/ *neu* –Positive Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**: 1789–1796
- Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA & Bargou R (2012) Blinatumomab: A historical perspective. *Pharmacol. Ther.* **136**: 334–342
- Nahta R & Esteva FJ (2007) Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* **26**: 3637–3643
- Nap M, Hammarstr   M-L, Schreyer M, Mach J-P, Buchegger F, Fuks A & Holm R (1992) Specificity and Affinity of Monoclonal Antibodies against Carcinoembryonic Antigen. : 12
- Nap M, Mollgard K, Burtin P & Fleuren GJ (1988) Immunohistochemistry of Carcino-Embryonic Antigen in the Embryo, Fetus and Adult. *Tumor Biol.* **9**: 145–153
- Neovii completes marketing authorisation withdrawal of Removab® in the European Union (2017) *Neovii* Available at: <https://neovii.com/neovii-completes-marketing-authorisation-withdrawal-of-removab-in-the-european-union/> [Accessed April 20, 2019]
- Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L & Facchini A (2001) Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 1131–1135
- Newman MJ & Benani DJ (2016) A review of blinatumomab, a novel immunotherapy. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **22**: 639–645
- Nimmerjahn F & Ravetch JV (2006) Fc   Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity* **24**: 19–28
- Nisonoff A & Rivers MM (1961) Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**: 460–462

- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V & Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody–FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* **13**: 1551–1559
- Öbrink B (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 616–626
- Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G & Nakazato H (1992) Homotypic and heterotypic Ca<sup>++</sup>-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 881–887
- Ortho Multicenter Transplant Study Group (1985) A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N. Engl. J. Med.* **313**: 337–342
- Pack P, Müller K, Zahn R & Plückthun A (1995) Tetravalent Miniantibodies with High Avidity Assembling in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **246**: 28–34
- Patel D, Bassi R, Hooper A, Prewett M, Hicklin DJ & Kang X (2009) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int. J. Oncol.*: 25–32
- Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriù G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M & Minenkova O (2006) Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* **6**: 41
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML & Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 8392–8396
- Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ & Allison JP (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti–CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* **206**: 1717–1725

- Pelat T, Hust M, Laffly E, Condemine F, Bottex C, Vidal D, Lefranc M-P, Dübel S & Thullier P (2007) High-Affinity, Human Antibody-Like Antibody Fragment (Single-Chain Variable Fragment) Neutralizing the Lethal Factor (LF) of *Bacillus anthracis* by Inhibiting Protective Antigen-LF Complex Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2758–2764
- Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A & Moretta L (2001) Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1076–1086
- Peng L, Oberst MD, Huang J, Brohawn P, Morehouse C, Lekstrom K, Baeuerle PA, Wu H, Yao Y, Coats SR, Dall'Acqua W, Damschroder M & Hammond SA (2012) The CEA/CD3-Bispecific Antibody MEDI-565 (MT111) Binds a Nonlinear Epitope in the Full-Length but Not a Short Splice Variant of CEA. *PLoS ONE* **7**: e36412
- Plückthun A & Pack P (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **3**: 83–105
- Pohl SC, Schwarz S, Frenzel A & Schirrmann T (2012) A Cassette Vector System for the Rapid Cloning and Production of Bispecific Tetravalent Antibodies. *Antibodies* **1**: 19–38
- Poirion C, Wu Y, Ginestoux C, Ehrenmann F, Duroux P & Lefranc M-P (2010) IMGT/mAb-DB: the IMGT® database for therapeutic monoclonal antibodies. *11èmes Journ. Ouvert. Biol. Inform. Mathématiques JOBIM Montp.*: 1
- Ratner M (2014) Genentech's glyco-engineered antibody to succeed Rituxan. *Nat. Biotechnol.* **32**: 6–7
- Rau R (2002) Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann. Rheum. Dis.* **61**: ii70–ii73

- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W & Jung H (2013) Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **31**: 413–441
- Redman JM, Hill EM, AlDeghaither D & Weiner LM (2015) Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol. Immunol.* **67**: 28–45
- Retter I, Althaus HH, Münch R & Müller W (2005) VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* **33**: D671–D674
- Reverts H, De Baetselier P & Muyldermans S (2005) Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**: 111–124
- Ridgway JBB, Presta LG & Carter P (1996) ‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng. Des. Sel.* **9**: 617–621
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H & Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**: 323–327
- Robbie GJ, Criste R, Dall’Acqua WF, Jensen K, Patel NK, Losonsky GA & Griffin MP (2013) A Novel Investigational Fc-Modified Humanized Monoclonal Antibody, Motavizumab-YTE, Has an Extended Half-Life in Healthy Adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 6147–6153
- Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu W-J, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, et al (2014) Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet* **384**: 1109–1117
- Robertson M & Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**: 2421–2438
- Rosenberg AS (2006) Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J.* **8**: E501–E507

- Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM & Chang C-H (2006) Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 6841–6846
- Rossi EA, Goldenberg DM & Chang C-H (2012) The Dock-and-Lock Method Combines Recombinant Engineering with Site-Specific Covalent Conjugation To Generate Multifunctional Structures. *Bioconjug. Chem.* **23**: 309–323
- Roux S, Amazit L, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Milgrom E & Mariette X (2002) RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B) and RANK Ligand Are Expressed in Giant Cell Tumors of Bone. *Am. J. Clin. Pathol.* **117**: 210–216
- Rual J-F, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, et al (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein–protein interaction network. *Nature* **437**: 1173–1178
- Runcie K, Budman DR, John V & Seetharamu N (2018) Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics. *Mol. Med.* **24**: 50
- Saeland E, Belo AI, Mongera S, Die I van, Meijer GA & Kooyk Y van (2012) Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. *Int. J. Cancer* **131**: 117–128
- Salih HR, Rammensee H-G & Steinle A (2002) Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J. Immunol.* **169**: 4098–4102
- Samara RN, Laguinge LM & Jessup JM (2007) Carcinoembryonic Antigen Inhibits Anoikis in Colorectal Carcinoma Cells by Interfering with Trail-R2 (DR5) Signaling. *Cancer Res.* **67**: 4774–4782

- Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, Tanaka E, Muto A, Kojima T, Kitazawa T, Yoshihashi K, Harada A, Funaki M, Haraya K, Tachibana T, Suzuki S, Esaki K, Nabuchi Y & Hattori K (2013) Identification and Multidimensional Optimization of an Asymmetric Bispecific IgG Antibody Mimicking the Function of Factor VIII Cofactor Activity. *PLOS ONE* **8**: e57479
- Sauerborn M (2014) The Immunogenicity of Therapeutic Antibodies. In *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Dübel S & Reichert JM (eds) pp 665–680. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Schaefer W, Regula JT, Bahner M, Schanzer J, Croasdale R, Durr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, Schwaiger M, Stubenrauch KG, Sustmann C, Thomas M, Scheuer W & Klein C (2011) Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 11187–11192
- Schaer DA, Hirschhorn-Cymerman D & Wolchok JD (2014) Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2**: 7
- Schenk A, Bloch W & Zimmer P (2016) Natural Killer Cells—An Epigenetic Perspective of Development and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 326
- Scherer WF & Syverton JT (1954) The Viral Range in Vitro of a Malignant Human Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey). *Am. J. Pathol.* **30**: 1057–1073
- Schirrmann T, Meyer T, Schütte M, Frenzel A & Hust M (2011) Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy. *Molecules* **16**: 412–426
- Schirrmann T & Pecher G (2002) Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T-cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Ther.* **9**: 390–398



- Schneider-Merck T, Bueren JJL van, Berger S, Rossen K, Berkel PHC van, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PWHI, Winkel JGJ van de, Valerius T & Dechant M (2010) Human IgG2 Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor Effectively Trigger Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity but, in Contrast to IgG1, Only by Cells of Myeloid Lineage. *J. Immunol.* **184**: 512–520
- Scott AM, Wolchok JD & Old LJ (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 278–287
- Screaton RA, DeMarte L, Dráber P & Stanners CP (2000) The Specificity for the Differentiation Blocking Activity of Carcinoembryonic Antigen Resides in Its Glycophosphatidyl-Inositol Anchor. *J. Cell Biol.* **150**: 613–626
- Sgro C (1995) Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* **105**: 23–29
- Sharkey RM, Juweid M, Shevitz J, Behr T, Dunn R, Swayne LC, Wong GY, Blumenthal RD, Griffiths GL, Siegel JA, Leung S, Hansen HJ & Goldenberg DM (1995) Evaluation of a Complementarity-Determining Region-Grafted (Humanized) Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody in Preclinical and Clinical Studies. *Cancer Res.* **55**: 5935s–5945s
- Shu L, Qi CF, Schlom J & Kashmiri SV (1993) Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 7995–7999
- Shuptrine C, Surana R & Weiner LM (2012) Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **22**: 3–13
- Siegel R, DeSantis C & Jemal A (2014) Colorectal cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* **64**: 104–117
- Smaglo BG, Aldeghaither D & Weiner LM (2014) The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**: 637–648
- Smith KGC & Clatworthy MR (2010) FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 328–343

- Spiess C, Merchant M, Huang A, Zheng Z, Yang NY, Peng J, Ellerman D, Shatz W, Reilly D, Yansura DG & Scheer JM (2013) Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nat. Biotechnol.* **31**: 753–758
- Spiess C, Zhai Q & Carter PJ (2015) Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol. Immunol.* **67**: 95–106
- Staerz UD, Kanagawa O & Bevan MJ (1985) Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* **314**: 628
- Stern N, Markel G, Arnon TI, Gruda R, Wong H, Gray-Owen SD & Mandelboim O (2005) Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. *J. Immunol.* **174**: 6692–6701
- Sullivan LA & Brekken RA (2010) The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *mAbs* **2**: 165–175
- Teeling JL, French RR, Cragg MS, Brakel J van den, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PWHI, Hack CE, Dechant M, Valerius T, Winkel JGJ van de & Glennie MJ (2004) Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **104**: 1793–1800
- The UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**: D506–D515
- Thomas DA, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Faderl S, Keating MJ, Giles FJ, Cortes J & Kantarjian HM (2003) Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood* **102**: 3906–3911
- Thomas P, Toth CA, Saini KS, Milburn Jessup J & Steele G (1990) The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1032**: 177–189
- Thompson JA, Grunert F & Zimmermann W (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* **5**: 344–366

- Thompson JA, Pande H, Paxton RJ, Shively L, Padma A, Simmer RL, Todd CW, Riggs AD & Shively JE (1987) Molecular cloning of a gene belonging to the carcinoembryonic antigen gene family and discussion of a domain model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 2965–2969
- Tjandra JJ, Ramadi L & McKenzie IFC (1990) Immunology and Cell Biology - Abstract of article: Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* **68**: 367–376
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI & Kahan BD (1976) Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* **12**: 180–191
- Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, Dombret H, Fielding AK, Heffner L, Larson RA, Neumann S, Foà R, Litzow M, Ribera J-M, Rambaldi A, Schiller G, Brüggemann M, Horst HA, Holland C, Jia C, et al (2015) Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **16**: 57–66
- Trinchieri G (1989) Biology of Natural Killer Cells. In *Advances in Immunology*, Dixon FJ (ed) pp 187–376. Academic Press
- Underwood PA (1993) Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. *J. Immunol. Methods* **164**: 119–130
- Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD & Leibson PJ (2006) NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat. Immunol.* **7**: 524
- Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G & Galluzzi L (2014) Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *OncoImmunology* **3**: e27048
- Vadstrup K & Bendtsen F (2017) Anti-NKG2D mAb: A New Treatment for Crohn's Disease? *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1997

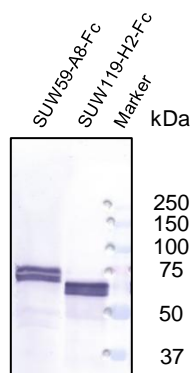
- Verma R, Boleti E & George AJT (1998) Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**: 165–181
- Vieira J & Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. In *Methods in Enzymology* pp 3–11. Academic Press
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**: 503–510
- Voges M, Bachmann V, Naujoks J, Kopp K & Hauck CR (2012) Extracellular IgC2 Constant Domains of CEACAMs Mediate PI3K Sensitivity during Uptake of Pathogens. *PLOS ONE* **7**: e39908
- Vonderheide RH, Bajor DL, Winograd R, Evans RA, Bayne LJ & Beatty GL (2013) CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62**: 949–954
- Vos Q, Klasen EA & Haaijman JJ (1987) The effect of divalent and univalent binding on antibody titration curves in solid-phase ELISA. *J. Immunol. Methods* **103**: 47–54
- Waldhauer I & Steinle A (2006) Proteolytic Release of Soluble UL16-Binding Protein 2 from Tumor Cells. *Cancer Res.* **66**: 2520–2526
- Weers M de, Tai Y-T, Veer MS van der, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst HM, Winkel JGJ van de & Parren PWHI (2011) Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *J. Immunol.* **186**: 1840–1848
- Weiner LM, Surana R & Wang S (2010) Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 317–327
- Wendtner C-M (2014) Otlertuzumab more than a TRU(E) toddler in CLL? *Blood* **123**: 1282–1284

- Weng W-K & Levy R (2003) Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **21**: 3940–3947
- WHO, Cancer Today 2018 Available at: <http://gco.iarc.fr/today/home> [Accessed April 30, 2019]
- Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, Robak T, Furman RR, Hillmen P, Trneny M, Dyer MJS, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell CA & Österborg A (2010) Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **28**: 1749–1755
- Williams AF (1987) A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol. Today* **8**: 298–303
- Williams AF & Barclay AN (1988) The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **6**: 381–405
- Wörn A & Plückthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **305**: 989–1010
- Wu AM & Senter PD (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1137–1146
- Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu R-R, Santora L, Davis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A & Ghayur T (2007) Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1290–1297
- Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL & Phillips JH (1999) An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285**: 730–732

- Yanagihara K, Tsumuraya M, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Ohuchi K & Seyama T (2010) An orthotopic implantation mouse model of human malignant pleural mesothelioma for in vivo photon counting analysis and evaluation of the effect of S-1 therapy. *Int. J. Cancer* **126**: 2835–2846
- Yang X-D, Jia X-C, Corvalan JRF, Wang P & Davis CG (2001) Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **38**: 17–23
- Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B & Lindhofer H (1999) Simultaneous Activation of T Cells and Accessory Cells by a New Class of Intact Bispecific Antibody Results in Efficient Tumor Cell Killing. *J. Immunol.* **163**: 1246–1252
- Zhou H, Stanners CP & Fuks A (1993) Specificity of Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibodies and Their Effects on CEA-mediated Adhesion. *Cancer Res.* **53**: 3817–3822

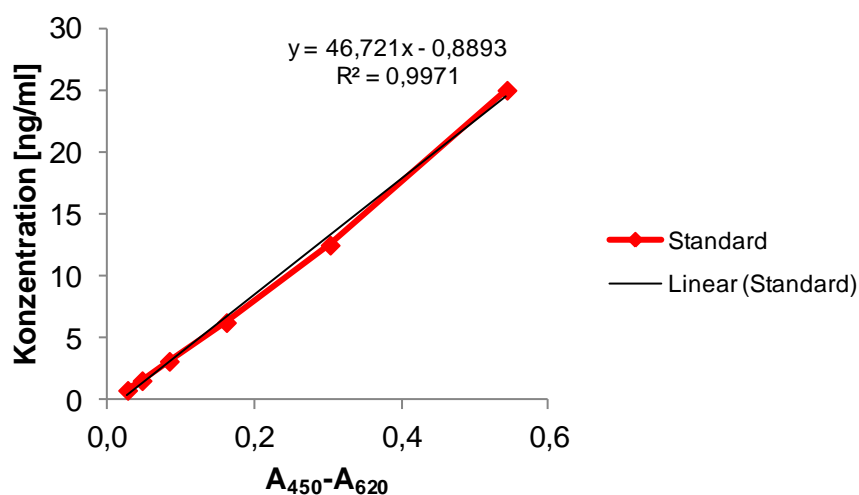
## 8 Anhang

### 8.1 scFv-Fc-Produktionskontrolle mittels Western Blot mit Immunfärbung und *Human Capture ELISA*



**Abbildung 8.1 Überprüfung der sekretorischen scFv-Fc-Produktion in HEK293-6E Zellen mittels Western Blot mit Immunfärbung**

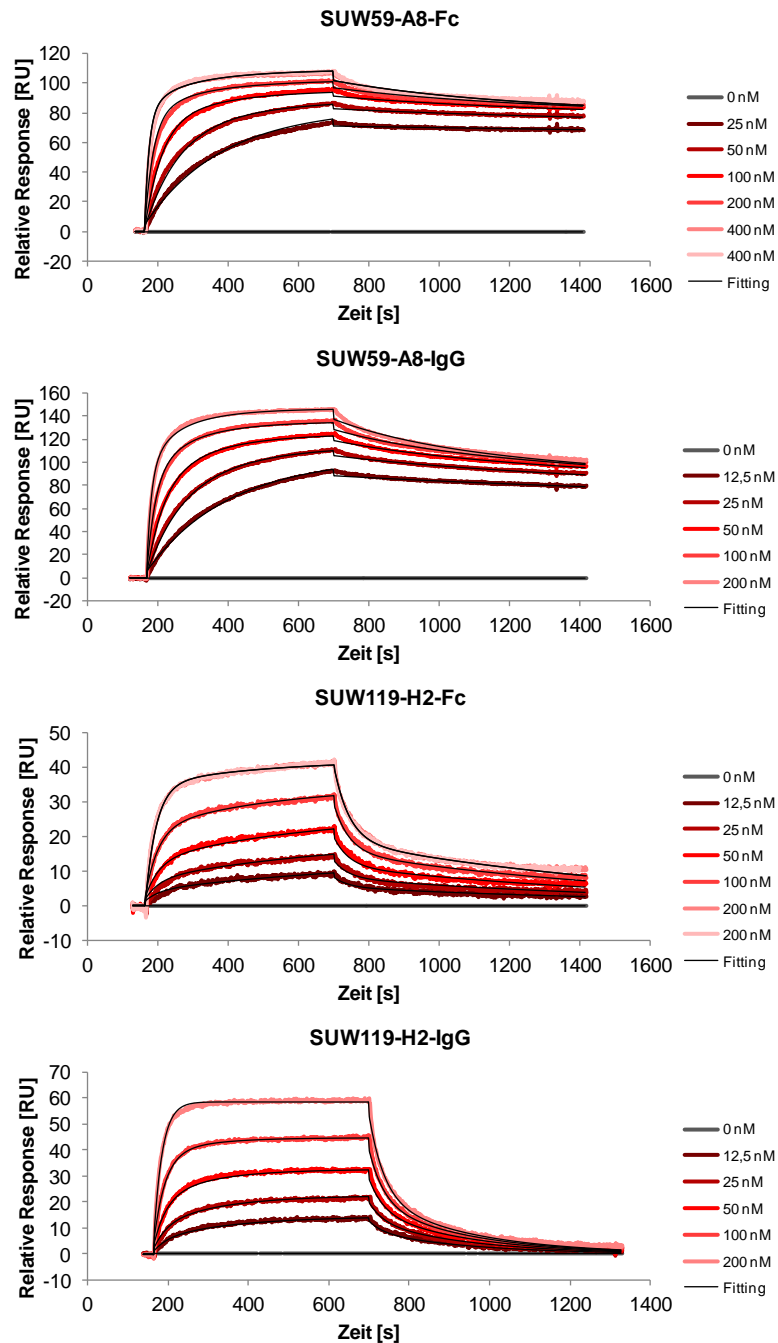
Jeweils 6,25  $\mu$ l Produktionsüberstand wurden in einer 12 % igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Der Nachweis erfolgte mit einem AP-konjugiertem Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und dem Substrat NBT/BCIP.



**Abbildung 8.2 Ermittlung der linearen Regression des Standards im *Human Capture ELISA***

Jede Kavität einer Mikrotiterplatte wurde mit einem polyvalenten Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörpermischung als Fängerantikörper beschichtet. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Überstände aus der Produktion der scFv-Fc-Antikörper in HEK293-6E und des Standards in verschiedenen Verdünnungen in die Vertiefungen gegeben. Der Nachweis erfolgte mit einem HRP-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und dem Substrat TMB. Anhand der bekannten Konzentration des Standards wurde die Gleichung für die lineare Regression bestimmt und damit die Konzentration der scFv-Fc-Antikörper ermittelt. Für SUW59-A8-Fc wurden  $c = 15,3$  ng/ $\mu$ l errechnet und für SUW119-H2-Fc  $c = 36,3$  ng/ $\mu$ l.

## 8.2 SPR-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2

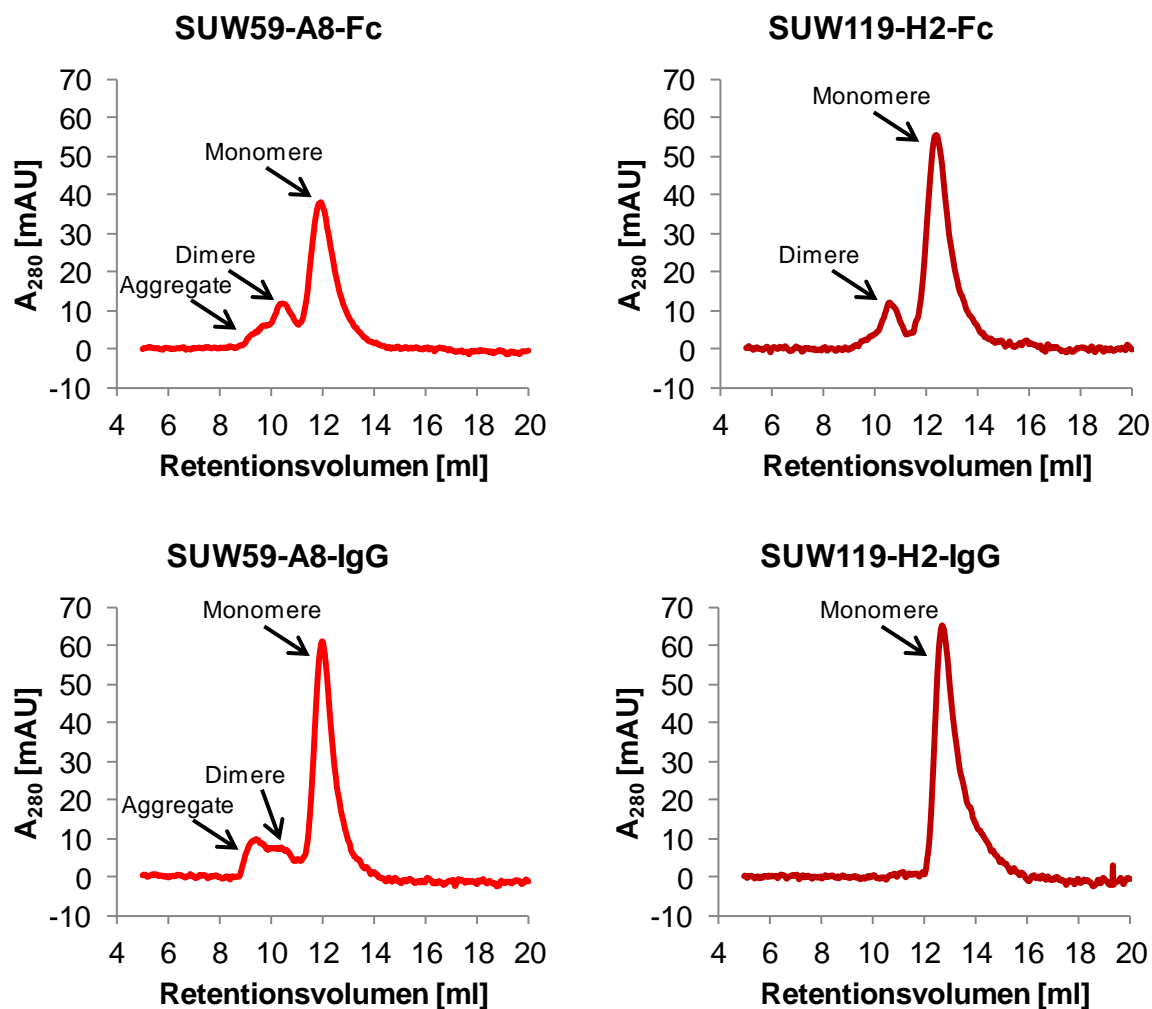


**Abbildung 8.3 SPR-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2**

Für die Messungen wurde das Antigen CEA-HIS als Ligand mit 2 µg/ml an einen CM5-Chip gekoppelt. Die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 wurden als bivalenter Analyt im scFv-Fc- und IgG-Format verwendet. Die Messungen erfolgten mit Antikörperkonzentrationen von 0-400 nM. Dargestellt sind die Sensogramme der Messungen.



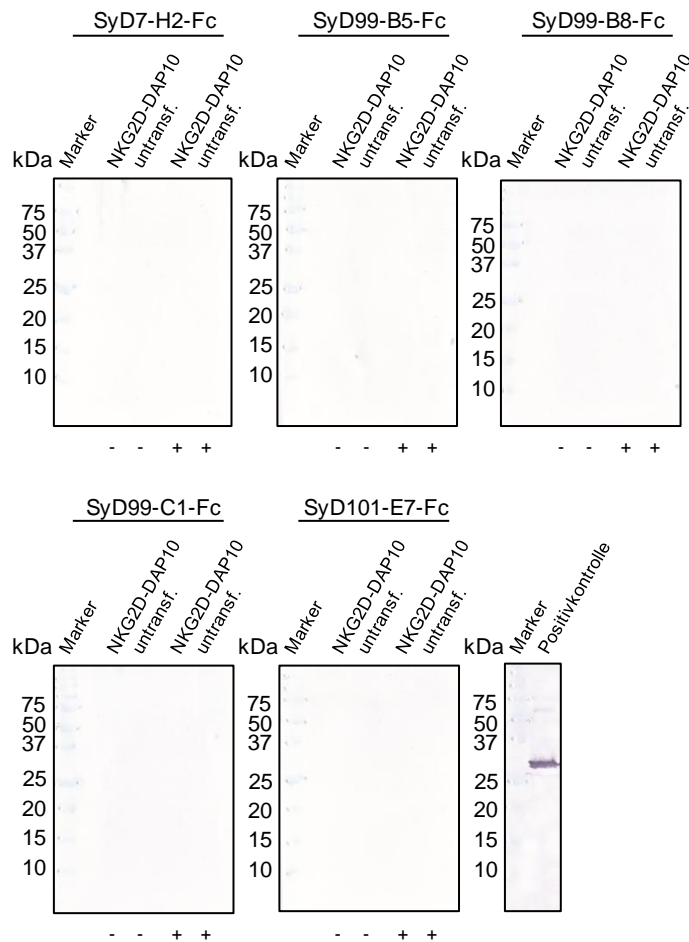
### 8.3 SEC-Messungen von SUW59-A8 und SUW119-H2



**Abbildung 8.4 SEC-Analysen von SUW59-A8 und SUW119-H2**

Die Antikörper SUW59-A8 und SUW119-H2 wurden im scFv-Fc- und IgG-Format mittels SEC analysiert. Dazu wurden 80 µg der aufgereinigten Antikörper auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule größenchromatografisch aufgetrennt. Dargestellt sind die Chromatogramme der einzelnen Messungen.

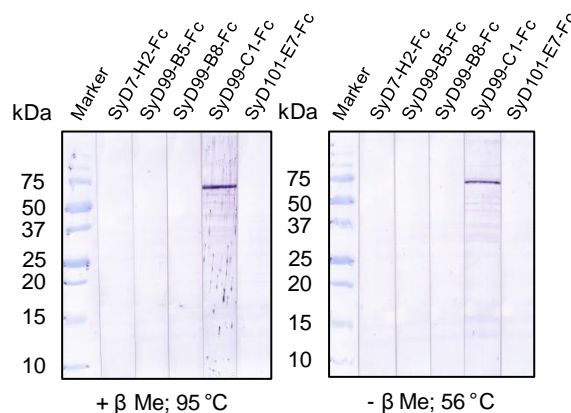
## 8.4 Western Blot und Immunfärbung mit NKG2D-spezifischen Antikörpern



**Abbildung 8.5 Western Blot mit Immunfärbung mit NKG2D-spezifischen Antikörpern im scFv-Fc-Format**

HEK293-6E-Zellen wurden mit NKG2D und FLAG-DAP10 cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion bzw. untransfiziert wurden die Zellen geerntet und Zelllysate unter reduzierenden (+) und nicht reduzierenden (-) Bedingungen hergestellt. Die Lysate wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurden 15 %ige SDS-PAA-Gele verwendet und pro Spur das Lysat von 50.000 Zellen aufgetragen. Nach dem Western Blot der Proteine erfolgte die Immunfärbung mit 1 µg/ml (10 µg gesamt) scFv-Fc-Antikörper. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten Ziege  $\alpha$ -human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper und das Substrat NBT/BCIP.

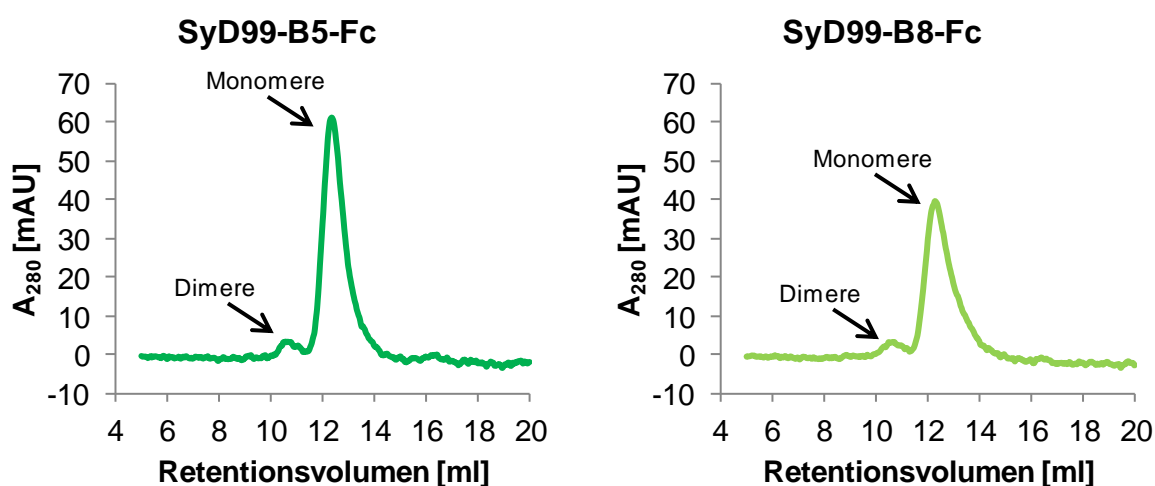
## 8.5 Western Blot mit Immunfärbung mit NK-92-Zellen



**Abbildung 8.6 Western Blot und Immunfärbung mit NK-92-Zellen und NKG2D-spezifischen Antikörpern**

Von der NK-Zelllinie NK-92 wurden Lysate unter reduzierenden (+ βMe; 95 °C) und nicht reduzierenden (-βMe; 56 °C) Bedingungen hergestellt. Je 10 μl der Lysate (entsprechend 100.000 Zellen) wurden anschließend auf 15 % ige SDS-PAA-Gele aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurden die Membranen in Streifen geschnitten und es erfolgte die Immunfärbung. Hierzu wurden jeweils 1 μg NKG2D-spezifischer scFv-Fc-Antikörper pro Streifen und ein AP-konjugierter Ziege α-human IgG (Fc-spezifisch) Antikörper sowie das Substrat NBT/BCIP verwendet. NKG2D besitzt eine molekulare Masse von ca. 20 kDa.

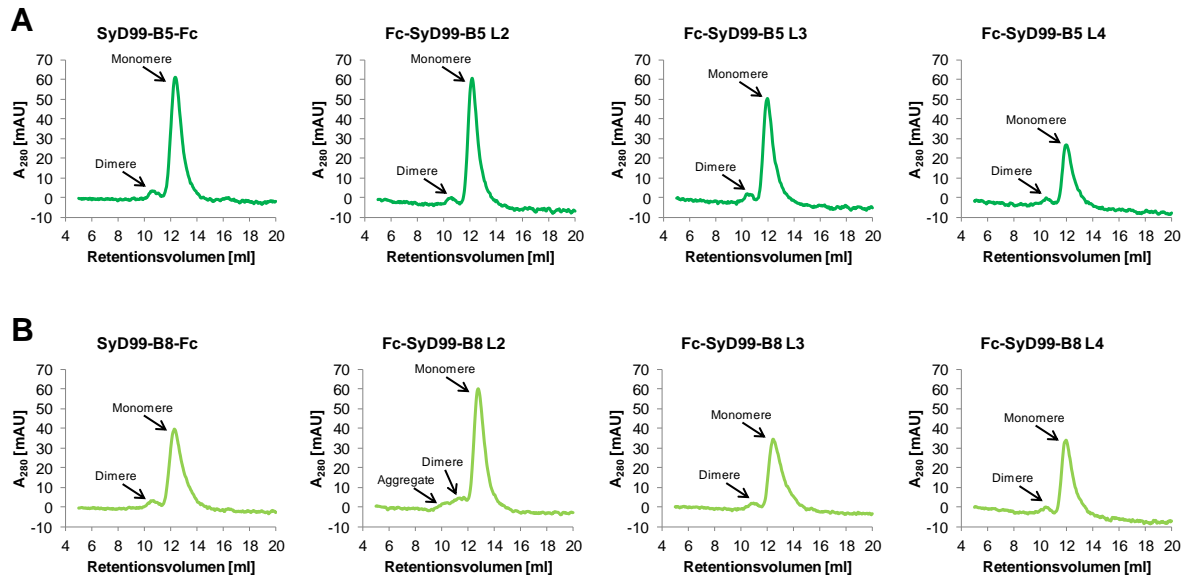
## 8.6 SEC-Messungen von SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc



**Abbildung 8.7 SEC-Analysen der NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 im scFv-Fc-Format**

je 80 μg der Antikörper SyD99-B5-Fc und SyD99-B8-Fc wurden auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule größenchromatografisch aufgetrennt. Dargestellt sind die Chromatogramme der Messungen.

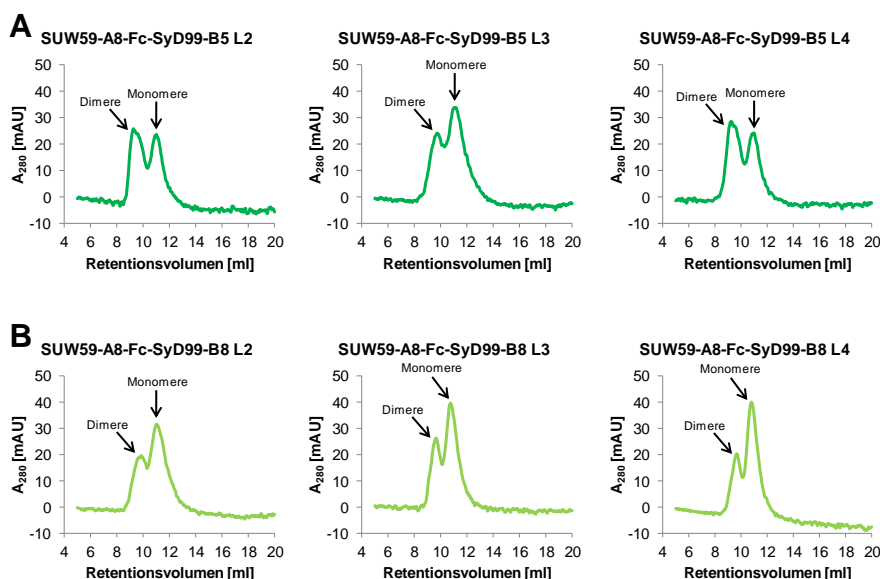
## 8.7 SEC-Messungen von scFv-Fc- und Fc-scFv-Antikörpern



**Abbildung 8.8 SEC-Analysen der NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5 und SyD99-B8 im scFv-Fc- und Fc-scFv-Format**

Je 50-80 µg der Antikörper im scFv-Fc- und Fc-scFv-Format wurden auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule größenchromatografisch aufgetrennt. Abbildung A zeigt die Chromatogramme der SyD99-B5-basierten Konstrukte. In Abbildung B sind die Chromatogramme der SyD99-B8-basierten Antikörper dargestellt. Bei L2, L3 und L4 handelt es sich um unterschiedliche Linkervarianten, die zur Fusion des C-terminalen scFv-Fragments verwendet wurden.

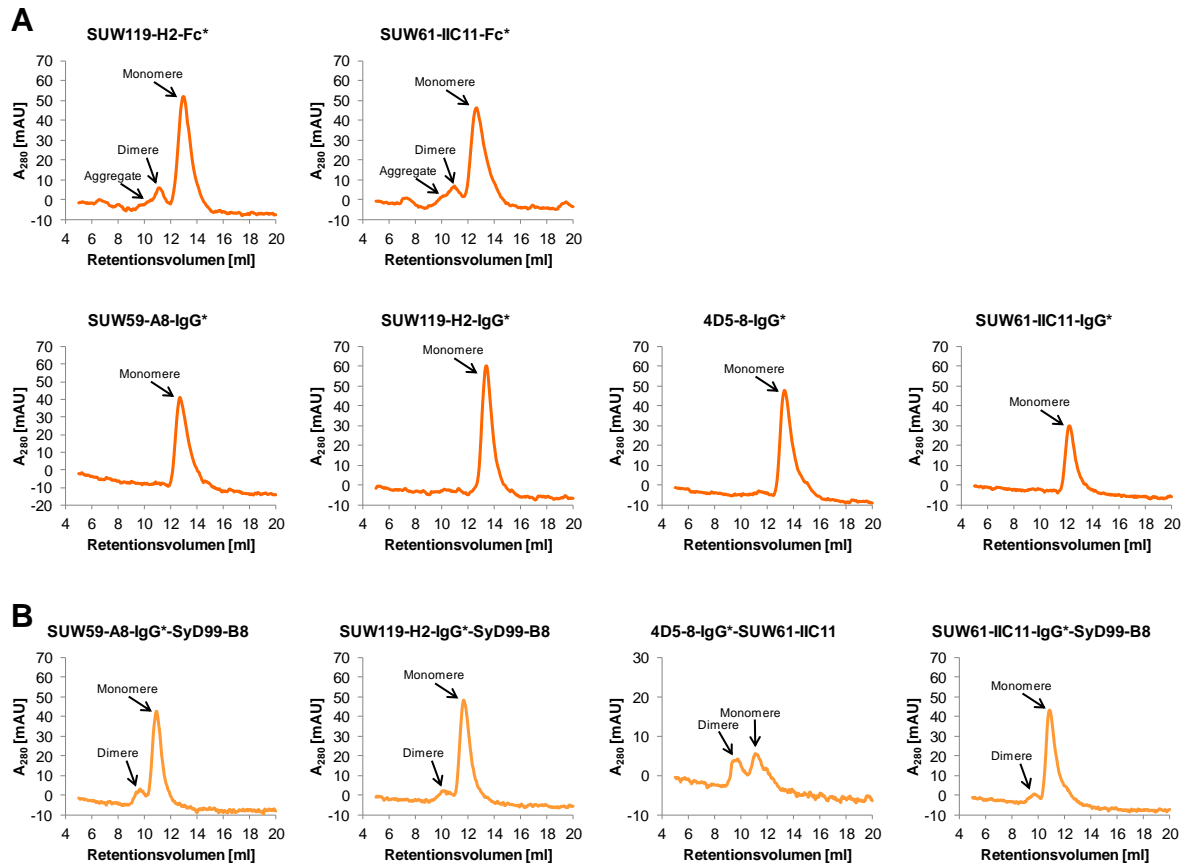
## 8.8 SEC-Messungen mit scFv-Fc-scFv-Antikörpern



**Abbildung 8.9** SEC-Messungen mit bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format

Von bispezifischen Antikörpern im scFv-Fc-scFv-Format wurden je 80 µg auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule größenchromatografisch aufgetrennt. Abbildung A zeigt die Chromatogramme der Konstrukte mit dem CEA-spezifischen Antikörper SUW59-A8 und dem NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B5. In Abbildung B sind die Chromatogramme der Antikörper mit SUW59-A8 und dem NKG2D-spezifischen Antikörper SyD99-B8 dargestellt. Bei L2, L3 und L4 handelt es sich um unterschiedliche Linkervarianten, die zur Fusion des C-terminalen scFv-Fragments verwendet wurden.

## 8.9 SEC von Antikörpern im scFv-Fc-, IgG- und IgG-scFv-Format mit ADCC-optimiertem Fc-Teil



**Abbildung 8.10 SEC-Messungen von Antikörpern mit ADCC-optimiertem Fc-Teil (\*)**

Von ausgewählten Antikörpern wurden jeweils 30-80  $\mu\text{g}$  Probe auf einer Superdex 200/10/300 Increase GL Säule größenchromatografisch aufgetrennt. Abbildung A zeigt die Chromatogramme der Antikörper im scFv-Fc\*- und IgG\*-Format. In Abbildung B sind die Chromatogramme der bispezifischen Antikörper im IgG\*-scFv-Format dargestellt.

## 8.10 Zytotoxizitätstest zur funktionellen Analyse von Antikörpern

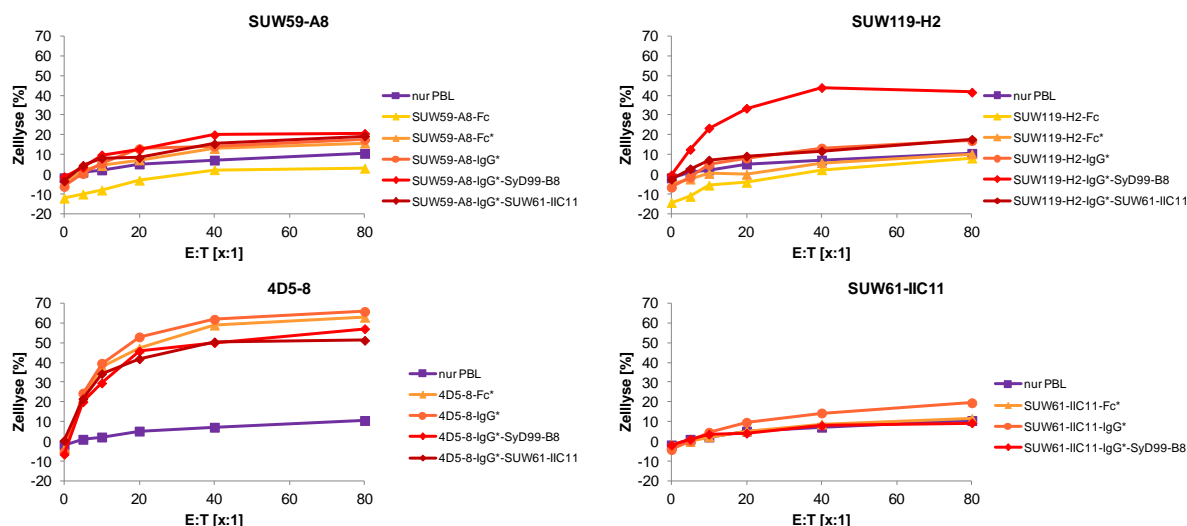


Abbildung 8.11 ADCC-Assay zum funktionellen Screening von Antikörpern

Für den Assay wurden LS-174T-Zellen als Zielzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM markiert. Anschließend wurden die Zielzellen zusammen mit peripheren Blutlymphozyten von Spender 2 und 45,45 nM des jeweiligen Antikörpers in Mikrotiterplatten inkubiert. Die Lymphozyten wurden in Verhältnissen von 0:1 bis 80:1 (E:T; Effektorzellen : Zielzellen) eingesetzt. Sämtliche Ansätze wurden in Dublikaten getestet.

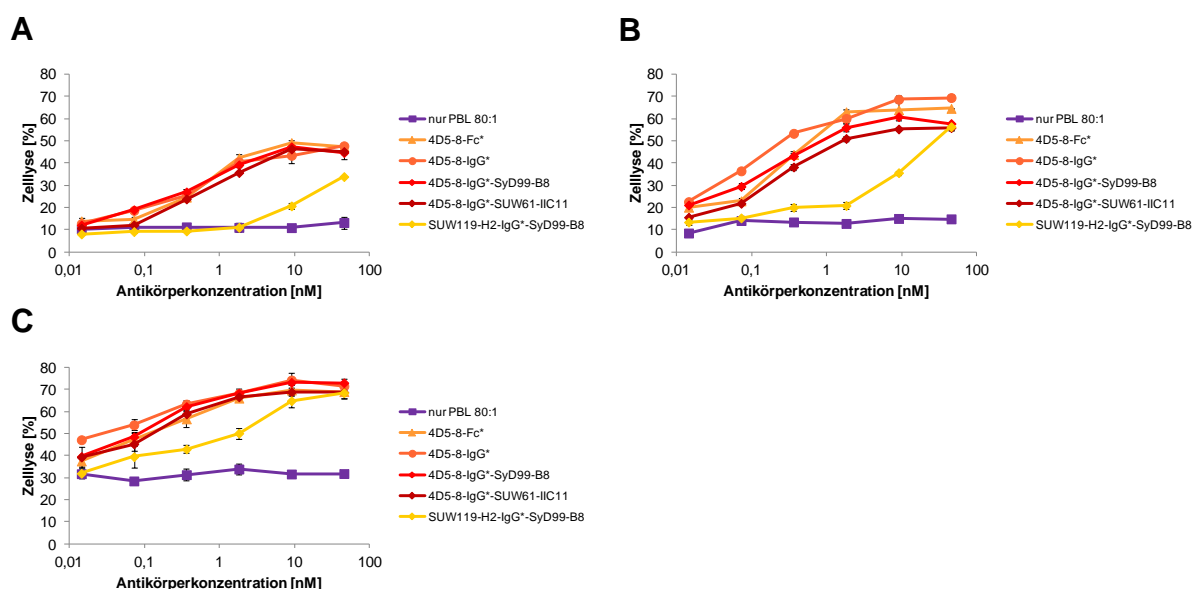
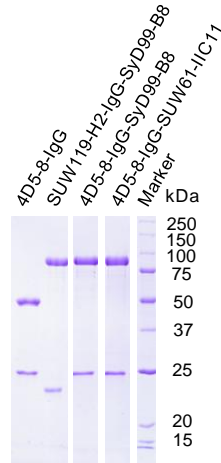


Abbildung 8.12 Titration von Antikörpern im ADCC-Assay

Für den Assay wurden LS-174-Zellen als Zielzellen verwendet und mit Calcein-AM markiert. Periphere Blutlymphozyten und die markierten Zielzellen wurden anschließend im Verhältnis 80:1 im ADCC eingesetzt. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 15 pM bis 45 nM im Test verwendet. Alle Ansätze wurden in Triplikaten getestet. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tests mit Lymphozyten von drei unterschiedlichen Spendern (A-C). Abweichungen wurden als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *Standard error of the mean*) berechnet.

## 8.11 Produktion von Antikörpern im IgG- und IgG-scFv-Format



**Abbildung 8.13 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zur Überprüfung von Produktion und Reinigung von IgG- und IgG-scFv-Antikörpern**

Nach Produktion und Reinigung der Antikörper wurde je 1 µg auf ein 12 % iges SDS-PAA-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. Neben dem generellen Erfolg der Produktion und Reinigung wurde das Vorhandensein der leichten und schweren Kette überprüft.



## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Mitarbeit und Promotion in seinem Institut. Vielen Dank für das interessante Thema und die Unterstützung auf diesem Weg.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Möglichkeit eines Aufenthalts in seiner Arbeitsgruppe, sowie die vielen hilfreichen Informationen und Tipps bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Hust für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Dr. Thomas Schirrmann danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Ideen und Vorschläge.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Atmosphäre im und außerhalb des Labors bedanken, sowie für die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Dr. André Frenzel, Dr. Anna Stanisak, Stefanie Behring, Doris Meier und Marlies Becker. Ihr seid einfach super!

Vielen Dank auch an Sylvia Dietrich und Sonja Schauer aus deren Masterarbeiten ich Konstrukte und Proben für meine Arbeit verwenden konnte.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie für den steten Rückhalt bedanken, und vor allem bei dir Torsten: Danke für deine Unterstützung in allen Lebenslagen und deine unendliche Geduld!

